



Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement.

Ophélie Zeyons

► To cite this version:

Ophélie Zeyons. Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement.. Physique [physics]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT: . tel-00331931

HAL Id: tel-00331931

<https://theses.hal.science/tel-00331931>

Submitted on 20 Oct 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de l'université Paris VI - Pierre et Marie Curie

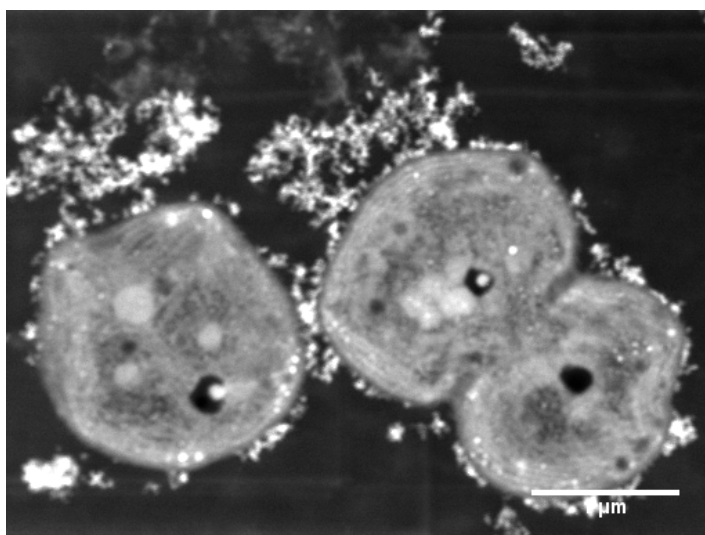
Ecole doctorale physique et chimie des matériaux

Spécialité : Physicochimie

Soutenue publiquement le 25 septembre 2008 par :

Ophélie ZEYONS

Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement.



Jury :

M. Laurent MICHOT	DR CNRS	Nancy
M. Chen-Cai ZHANG	Professeur	Aix-Marseille
Mme Valérie CABUIL	Professeur à l'UPMC	Paris
Mme Dominique LANGEVIN	DR	Orsay
M. Franck CHAUVAT	DR	Saclay
M. Olivier SPALLA	DR (directeur de thèse)	Saclay

Interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement.

Grâce à leurs propriétés particulières dues à leur petite taille, les nanomatériaux (dimension < 100 nm) sont utilisés dans de nombreuses applications grand public (cosmétique, matériaux nanostructurés,...). Cependant, leur présence grandissante inquiète car leur impact potentiel sur les humains et l'environnement reste mal connu. Cette étude est consacrée à une compréhension approfondie des interactions physicochimiques et biologiques entre deux modèles cellulaires présents dans l'environnement : *Synechocystis* (cyanobactérie contribuant au maintien de la biosphère) et *Escherichia coli* (bactérie des intestins des mammifères) avec des nanoparticules d'oxyde de cérium (abondance environnementale croissante, ex : additif au diesel).

La complexité de l'étude des nanoparticules nécessite une approche différente (multidisciplinaire) de celle des tests de toxicité utilisés pour les composés classiques. En effet, nous montrons que les paramètres physicochimiques (stabilité, agrégation, dissolution et état de surface) des nanoparticules dans le milieu de contact, influencent fortement la toxicité observée sur les cellules. De plus, les interactions physicochimiques (floculation, adsorption, mécanismes redox) sont liées au modèle biologique, en particulier à la présence d'exopolysaccharides (chez *Synechocystis*) comme barrière naturelle entre la paroi cellulaire et les nanoparticules. La composition du milieu de dispersion des nanoparticules (notamment son pH) a aussi une influence majeure sur la toxicité (survie et intégrité membranaire). Tandis que pour *E. coli*, ce sont majoritairement les nanoparticules qui provoquent la mortalité (confirmé par analyses métabonomiques par RMN).

Physicochemical and biological interactions between manufactured nanoparticles and environmental bacteria.

Thanks to their particular properties due to their size, the nanomaterials (dimension < 100 nm) are widely used in many industrial applications (daily care products, nanostructured materials...). However, their growing use frightens because of their uncertain impact on humans and environment. This study is dedicated to a deep understanding of the physicochemical and biological interactions between two cellular models from the environment: *Synechocystis* (cyanobacteria essential for the biosphere) and *Escherichia coli* (bacteria of mammalian intestines) with cerium oxide nanoparticles (ex: diesel additive).

The complexity of the study of nanoparticles requires a different approach (multidisciplinary) from those of toxicity tests of classic compounds. Indeed, we showed that the physicochemical parameters (stability, aggregation, dissolution and surface chemistry) of nanoparticles in the contact medium, strongly influence the toxicity. Furthermore, the physicochemical interactions (flocculation, adsorption, redox mechanisms) are linked to the biological model and especially the presence of exopolysaccharides (for *Synechocystis*) as natural barrier between the cell wall and the nanoparticles. Moreover, the composition of the nanoparticles dispersion medium (particularly the pH) has a major influence on the toxicity (survival and membrane integrity), whereas for *E. coli*, the nanoparticles are the main culprits for the mortality (confirmed by metabonomic studies via NMR).

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Eric Elliot et Jean Daillant pour leur accueil au sein, respectivement, du Service de Chimie Moléculaire et du Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire du CEA Saclay.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du programme ECCO financé par l'Agence Nationale de la Recherche.

Je remercie Chen-Cai Zhang ainsi que Laurent Michot d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Dominique Langevin et Valérie Cabuil d'avoir fait partie du jury. Merci beaucoup pour vos conseils et remarques sur ce travail.

Un grand merci à mon quatuor de chefs : Olivier Spalla, Franck Chauvat, Antoine Thill et Corinne Cassier-Chauvat. Chacun de vous a été présent à des moments différents mais clefs de ma thèse pour fournir conseils, écoute et soutien tout en me laissant suffisamment d'autonomie pour gérer ces recherches. Olivier et Franck, je vous suis particulièrement reconnaissante d'avoir accepté de corriger mon manuscrit avec rapidité et efficacité et me permettre ainsi de soumettre dans les temps. Antoine, j'espère n'avoir pas trop dénaturé ta vision initiale de ce sujet.

Ce travail à l'interface de plusieurs disciplines m'a amené à rencontrer des gens de tous horizons et spécialités, chaque rencontre a été extrêmement enrichissante. Un grand merci notamment à : Nicolas Menguy, pour les magnifiques images de microscopie et cartographie que tu as réalisées dans un froid sibérien à Boucicaud mais avec gentillesse et bonne humeur ; Jean Daraspe pour la beauté de tes coupes de bactéries réalisées pour les images TEM à l'iBiTec-S et pour nos discussions enflammées sur la biologie cellulaire et l'orfèvrerie ; Pascale Jegou pour tes nuits au SPCSI à passer mes échantillons d'XPS et m'avoir remonté le moral dans des périodes de doutes.

Un immense merci également à Gaspard Huber du service RMN, grâce à ta motivation et ton acharnement nous avons finalement pu faire parler la métabonomique.

Les expériences de chimie lors de ma thèse ont été assez limitées, néanmoins je tiens à remercier Corinne Chanéac de m'avoir gentiment permis de compenser ce manque en m'aidant à synthétiser des nanoparticules dans une ambiance conviviale au CMC.

Merci à Clarisse Mariet pour son aide, son professionnalisme et sa bonne humeur lors des expériences d'ICP.

Les expériences réalisées à BM30b n'auraient jamais pu se faire sans l'implication et l'aide précieuse d'Olivier Proux et Jean-Louis Hazmann. Je tiens également à remercier Mélanie Auffan, qui m'a précédée sur ce sujet, et Jérôme Rose du CEREGE pour leurs conseils avisés sur l'EXAFS et le XANES donnés avec gentillesse et bonne humeur aussi bien au soleil d'Aix qu'à 2h du matin à l'ESRF.

Merci aux deux autres thésardes du projet ECCO : Valérie Siron et Angélique Rousseau. J'ai été contente de faire votre connaissance et de pouvoir enfin discuter de ce sujet avec des

personnes qui en ont également éprouvé toutes les difficultés ! Bon courage pour la suite. Merci également à Roseline Iliou pour ses conseils pertinents et son aide sur *E. coli*.

Bien évidemment, je souhaite remercier toutes les personnes travaillant dans mon laboratoire officiel (le LIONS) et dans mon laboratoire d'adoption (le LBI). Je ne pense pas qu'il y ait eu une personne de ces deux équipes que je ne puisse pas remercier pour son accueil, sa gentillesse ou une aide ponctuelle.

Je tiens à remercier en particulier Elodie Collard, notamment pour ses conseils pour dompter l'électrophorèse capillaire et son efficacité pour accélérer les commandes. Un grand merci à Olivier Taché pour avoir su résoudre avec rapidité et efficacité des milliers de problèmes plus ou moins importants qui sont survenus au cours de cette thèse. Olivier : tu es une perle pour un laboratoire. Je remercie également Lauren Mata, car tu as non seulement toujours été présente et efficace dans l'aide que tu m'as apportée au laboratoire mais également comme amie pendant tous les moments de déprime ou d'enthousiasme que j'ai traversés.

Enfin, spéciale dédicace à tous les thésards, post-docs, stagiaires et autres non-permanents que j'ai côtoyés pendant ces 3 ans et qui les ont rendu si plaisants, alors en essayant d'oublier personnes, pour les physicochimistes, merci à : Linda, Mathilde, Céline, Youlia et Perrine (je suis plus que contente d'avoir fait votre connaissance les filles et j'attends avec impatience nos prochaines soirées) ; Fred, Fabien, Nicolas, Benjamin, Pierre, Luc, Sylvain, Aurélie, Debassis, Pang Hung, Wolfram, Caroline, Agnès, Geli, Martin, Daniel, Markus et Stephan. Et pour les biologistes, merci à : Martial (merci de m'avoir tout de suite accueillie dans la cyanoteam et de m'avoir montré l'étendue des utilisations de la carboglace), Cyril (je ne pourrai jamais suffisamment te remercier pour tout ce que tu m'as appris en génétique et sur les grues cendrées, les corneilles, les poules d'eau, les verres luisants...), Kinsley, Sandrine, Pierre, Antoine, Cédric (merci pour ton aide), Ju-Yang et Arounie (et les boules coco).

Merci à tous et bonne chance pour l'avenir.

Pour finir je voudrais remercier profondément mes parents (merci pour votre amour, votre soutien et toutes les relectures de cette thèse) et ma Floflo adorée. Un grand merci plein d'amour à mon petit chimiste Bavarois (merci pour ta gentillesse, tes sourires et de m'avoir supportée dans tous les sens du terme pendant ces 3 ans).

Enfin, une petite pensée tendre pour celles qui nous ont quittés trop tôt : Colette et Annette.

Table des matières

Abréviations	12
Introduction	13
I. Contexte – Présentation de l'étude	17
I.1 Le monde des nanos	21
I.1.1 Définition et propriétés caractéristiques des nanoparticules	21
I.1.2 Impact des nanotechnologies sur l'économie	25
I.2 Risques potentiels des nanotechnologies	29
I.2.1 Bases d'une réflexion scientifique	29
I.2.2 Conséquences : de nombreux débats de sociétés et rapports gouvernementaux	31
I.3 Etudes sur la « nanotoxicité » et difficultés rencontrées	33
I.3.1 Origine des difficultés liées à la « nanotoxicité »	33
I.3.2 Particularités de la toxicité environnementale	37
I.4 Présentation de l'étude	39
I.4.1 Description du modèle	39
I.4.2 Les études de nanotoxicité appliquées aux bactéries	49
I.5 Références bibliographiques	61
II. Présentation des modèles	67
II.1 Présentation des modèles biologiques	71
II.1.1 <i>Synechocystis</i>	71
II.1.2 <i>Escherichia coli</i>	77
II.2 Présentation des nanoparticules de CeO₂	79
II.2.1 Applications industrielles de nanoparticules (NPs) de CeO ₂	79
II.2.2 Caractéristiques morphologiques des NPs de CeO ₂ utilisées lors de cette étude	83
II.3 Matériels et méthodes	89
II.3.1 Milieux tests	89
II.3.2 Cultures cellulaires	89
II.3.3 Préparation des cultures pour les tests avec NPs	91
II.3.4 Préparation des nanoparticules et ions	91
II.4 Références bibliographiques	95
III. Physicochimie des nanoparticules	97
III.1 Stabilité physicochimique des nanoparticules	101

III.1.1	Introduction à la stabilité colloïdale	101
III.1.2	Importance de la stabilité lors des tests de toxicité	107
III.2	Caractérisation de la stabilité des nanoparticules de CeO₂	115
III.2.1	Agrégation	115
III.2.2	Oxydoréduction - Diagramme de Pourbaix	119
III.2.3	Suivi cinétique de la dissolution par ICP-MS	123
III.2.4	Modèle de réduction/dissolution	123
III.3	Matériels et méthodes	131
III.3.1	Diffusion de lumière dynamique (DLS)	131
III.3.2	Spectrométrie de masse quadripolaire à source plasma (ICP-MS)	131
III.3.3	Spectroscopie de photoélectron X (XPS)	133
III.4	Références bibliographiques	137
IV.	Physicochimie des interactions entre nanoparticules et cellules.	141
IV.1	Echelle macroscopique : floculation cellulaire en présence de nanoparticules	145
IV.1.1	Observation de la floculation en présence de nanoparticules	145
IV.1.2	Impact de la floculation dans un contexte environnemental	149
IV.2	Echelle microscopique : interactions spécifiques à chaque modèle biologique	153
IV.2.1	Différents modèles d'adsorption des nanoparticules sur les cellules	153
IV.2.2	Localisation à l'échelle de la cellule	161
IV.2.3	Influence des exopolysaccharides (EPS) de <i>Synechocystis</i>	169
IV.3	Mécanismes d'oxydoréduction lors d'un contact nanoparticules/cellules	185
IV.3.1	Analyses XPS	185
IV.3.2	Analyses XANES	187
IV.3.3	Conclusions sur les mécanismes d'oxydoréduction	191
IV.4	Matériels et méthodes	195
IV.4.1	Electrophorèse capillaire	195
IV.4.2	Mobilité électrophorétique	197
IV.4.3	Microscopie électronique en transmission (MET)	199
IV.4.4	Microscopie électronique à balayage (MEB)	199
IV.4.5	Analyse dispersive en énergie (XEDS)	201
IV.4.6	Spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES)	203
IV.5	Références bibliographiques	205
V.	Différents mécanismes de toxicité	209
V.1	Toxicité liée à un contact indirect avec des nanoparticules : le cas de <i>Synechocystis</i>	215
V.1.1	Première approche sur la toxicité des nanoparticules	215

V.1.2	Un mécanisme indépendant de l'effet « nano »	225
V.1.3	Conclusion sur les toxicités indirectes	231
V.2	Toxicité due à un contact direct avec les nanoparticules : le cas d'<i>E. coli</i>	231
V.2.1	Augmentation de la mortalité bactérienne par contact direct avec des NPs	233
V.2.2	Mise en évidence d'interférences liées aux nanoparticules dans les tests de fluorescence	235
V.3	Toxicité des nanoparticules : début de réponse grâce à la métabonomique.	239
V.3.1	Principe de l'étude	239
V.3.2	Analyse des résultats	243
V.3.3	Conclusion sur l'analyse métabonomique	253
V.4	Etude de l'influence des exopolysaccharides : construction de mutants.	255
V.4.1	Construction des mutants d'EPS de <i>Synechocystis</i>	255
V.4.2	Résultats	259
V.5	Matériels et méthodes	269
V.5.1	Tests de survie en milieu solide (« test en gouttes »)	269
V.5.2	Test de survie : dénombrement de colonies (CFU)	271
V.5.3	Test d'intégrité membranaire (LIVE/DEAD)	273
V.5.4	Métabonomique	275
V.5.5	Construction des mutants	279
V.5.6	Extraction et analyse des exopolysaccharides	287
V.6	Références bibliographiques	289
	Conclusion et perspectives	293
	Tables des matières des figures	299
	Table des matières des photographies	303
	Table des matières des tableaux	305
	Annexes - Résultats	307
	Annexes - Méthodes	321

Abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine triphosphate
CFU	Nombre de colonies formées
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Spectroscopie d'analyse dispersive en énergie
EPS	Exopolysaccharides
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
GSH	Glutathion
His	Histidine
Ile	Isoleucine
Lac	Lactate
Leu	Leucine
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission
NPs	Nanoparticules
PLS/DA	Analyse discriminante des moindres carrés
Pro	Proline
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
Thr	Thréonine
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
Val	Valine
XANES	Spectroscopie d'absorption des rayons X près du seuil
XPS	Spectroscopie de photoélectrons X

Introduction

La fin du XX^{ème} et le début de XXI^{ème} siècles ont vu l'apparition d'un nouveau genre de matériaux : les nanoparticules, c'est-à-dire des particules de dimensions inférieures à 100 nm. Nous n'évoquerons pas dans cette étude les nanoparticules d'origines naturelles, issues des volcans ou des incendies, qui existent depuis des millénaires, mais les nanoparticules manufacturées intentionnellement par l'homme.

Malgré leurs compositions et leurs tailles très diverses, elles sont toutes regroupées sous le terme générique de « nanoparticule ». Cette catégorisation en fonction de la taille n'est pas courante, elle prend cependant tout son sens lorsque l'on considère l'importance de la taille sur l'ensemble des propriétés (électroniques, magnétiques, catalytiques, mécaniques ou encore biologiques) que présentent les nanoparticules. Celles-ci offrent des avantages dans des domaines très variés, ce qui explique que leur usage, déjà dans plus de 600 applications grand public (produits cosmétiques, optiques, pots catalytiques,...), va être amené à s'amplifier et se diversifier dans les vingt prochaines années.

Parallèlement à cet engouement scientifique et industriel, leur toxicité potentielle inquiète. En effet, il existe une incertitude réelle quant à leurs impacts sur les humains et l'environnement. Les raisons de cette inquiétude scientifique sont basées sur la méconnaissance des interactions existantes entre les nanoparticules et les systèmes biologiques. En effet, les tests classiques de toxicité ne permettent pas de répondre aux questions spécifiquement liées à l'aspect « nano ». Par exemple, la taille, la stabilité en suspension ou la chimie de surface sont des paramètres habituellement non pris en compte mais qui, dans ce contexte, revêtent une importance cruciale. Bien que les gouvernements et les sociétés de consommateurs commencent également à être sensibilisés à ce problème, il n'existe, à l'heure actuelle, aucune législation ni protocole de toxicité spécifiques à l'utilisation des nanoparticules. Ceci s'explique par le fait que les interactions observées, dans les études existantes, semblent être explicables au cas par cas suivant le type de nanoparticules et le système biologique étudiés et le test employé. Elles sont souvent difficilement comparables entre elles et de ce fait parfois même contradictoires. Il est donc impossible de conclure de manière générale sur les risques réels liés à leur utilisation.

Des études scientifiques récentes dédiées à ce problème mettent en exergue la nécessité de comprendre en profondeur les mécanismes mis en jeu avant de tenter une uniformisation des protocoles. C'est ce à quoi nous tâcherons de répondre dans cette étude en utilisant pour cela deux systèmes biologiques bien représentés dans l'environnement : *Synechocystis* (cyanobactérie, impliquée dans le maintien de la biosphère) et *Escherichia coli* (bactérie colonisatrice des intestins de mammifères et présente dans l'environnement) et des nanoparticules de CeO₂ (largement utilisées notamment dans les pots catalytiques). Après une revue des travaux permettant d'établir le contexte de cette étude, nous présenterons, dans une première partie, les modèles biologiques et nanoparticulaires. Puis la physicochimie de ce type d'étude, et notamment dans le cas particulier des nanoparticules de CeO₂, sera discutée dans une deuxième partie. Les interactions physicochimiques et biologiques entre nanoparticules et cellules seront étudiées respectivement dans une troisième et une quatrième partie en fonction des paramètres physicochimiques, du modèle biologique et du milieu de contact. Nous conclurons sur les différents paramètres à prendre en compte lors d'un contact nanoparticules-cellules, ainsi que sur les mécanismes de toxicité mis en jeu et leur éventuel impact environnemental.

I. Contexte – Présentation de l'étude

I.1	Le monde des nanos	21
I.1.1	Définition et propriétés caractéristiques des nanoparticules	21
I.1.1.1	Pourquoi une définition par l'échelle ?	21
I.1.1.2	Quelques propriétés des nanoparticules	23
I.1.2	Impact des nanotechnologies sur l'économie	25
I.2	Risques potentiels des nanotechnologies	29
I.2.1	Bases d'une réflexion scientifique	29
I.2.2	Conséquences : de nombreux débats de sociétés et rapports gouvernementaux	31
I.3	Etudes sur la « nanotoxicité » et difficultés rencontrées	33
I.3.1	Origine des difficultés liées à la « nanotoxicité »	33
I.3.2	Particularités de la toxicité environnementale	37
I.4	Présentation de l'étude	39
I.4.1	Description du modèle	39
I.4.1.1	Choix des nanoparticules	39
I.4.1.2	Choix du milieu liquide	41
I.4.1.3	Choix des organismes modèles	43
I.4.1.4	Choix de la dose et du temps d'incubation	47
I.4.2	Les études de nanotoxicité appliquées aux bactéries	49
I.4.2.1	Présence de nanoparticules intra- et extracellulaires	49
I.4.2.2	Influence de la taille, dissolution et agrégation des nanoparticules	51
I.4.2.3	Toxicité engendrée par la production d'espèces radicalaires oxydantes (ROS)	53
I.4.2.4	Influence de la composition des nanoparticules	55
I.4.2.5	Comparaison toxicité humaine et bactérienne – cas de l'oxyde de cérium	57
I.5	Références bibliographiques	61



Figure 1 Illustration de la structure d'un fullerène nC60. (crédit : Chris Ewels)

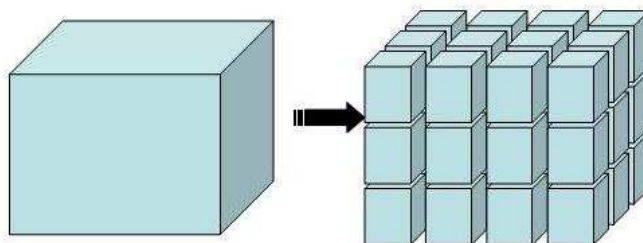


Figure 2 Illustration de la corrélation entre taille et surface spécifique.

Les motivations générales de ce travail sont présentées dans ce chapitre. Les deux aspects principaux qui seront traités concernent d'un côté une montée en puissance de l'utilisation des nanoparticules pour des applications grand public et de l'autre une incertitude scientifique, mais également sociétale et politique quant à leur impact sur le monde de demain.

I.1 Le monde des nanos

I.1.1 Définition et propriétés caractéristiques des nanoparticules

Les nanoparticules sont des objets relativement fréquents. Il existe en effet différentes sources de production des nanoparticules : les sources naturelles (incendies, éruptions volcaniques ...), les sources accidentelles (feux de bois, gaz d'échappement de véhicule, freinage,...) et les sources industrielles (nanoparticules manufacturées intentionnellement par l'homme). Ce sont sur ces dernières que nous allons nous focaliser plus précisément dans cette étude.

I.1.1.1 Pourquoi une définition par l'échelle ?

Le terme de « nanoparticule » est utilisé lorsque la particule a au moins une de ses dimensions inférieure à 100 nm. Le rayon typique d'un atome étant de l'ordre de 0,1 nm, une nanoparticule peut-être constituée de quelques dizaines à plusieurs centaines d'atomes. Par exemple, les nanoparticules les plus célèbres, les fullerènes, sont constituées de seulement 60 ou 70 atomes de carbone (Figure 1). Leur très petite taille donne aux nanoparticules des surfaces spécifiques très importantes. Pour s'en convaincre il suffit de considérer une microparticule cubique d'un micromètre de côté, le volume de cette microparticule sera de : $1 \mu\text{m}^3$ et sa surface spécifique de $6 \mu\text{m}^2$. Si l'on considère à présent que cette microparticule (de $1 \mu\text{m}^3$) est composée de nanoparticules cubiques de 1 nm de côté (soit 10^9 nm^3), la surface spécifique cumulée de toutes les nanoparticules sera de $6 \cdot 10^9 \text{ nm}^2$, soit $6 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$. A volume égal, la surface spécifique développée par les nanoparticules est donc 1000 fois plus importante que celle d'une microparticule (Figure 2). De même, le nombre d'atomes de surface augmente avec la diminution de la taille des nanoparticules et la réactivité étant souvent liée à des propriétés de surface, cela explique l'intérêt développé pour les nanoparticules.

La définition par l'échelle ne suffit cependant pas à décrire tous les aspects des nanoparticules. En effet, leur réactivité est également fortement liée à leur composition qui

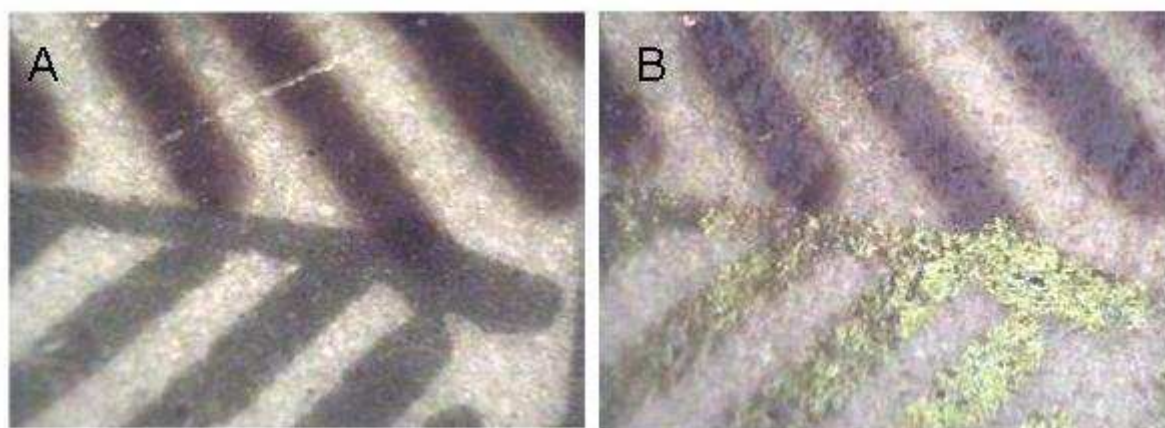


Figure 3 Agrandissement d'une assiette antique décorée d'un palmier. Cette décoration utilise la technique du lustre (ici vert et marron).
Sur l'image B la surface de l'échantillon a été inclinée pour mettre en lumière le reflet doré du lustre vert et son absence sur le lustre marron. (Pradell 2008)

peut être très variée. On distingue par exemple les nanoparticules organiques (constituées majoritairement de polymères), des métalliques (ex : nanoparticules d'or ou d'argent), d'oxydes métalliques (ex : Fe_2O_3 , TiO_2) ou encore des composites (ex : quantum dots CdSe-ZnS).

I.1.1.2 Quelques propriétés des nanoparticules

Les nanoparticules, jonction entre l'échelle atomique et le matériau, ont des particularités structurales très spécifiques. En effet, contrairement aux matériaux classiques, les nanoparticules voient leurs propriétés changer en fonction de leur taille. Elles sont soumises à la fois aux phénomènes de la physique classique et à ceux de la physique quantique lorsqu'elles sont de très petite taille. Les principales propriétés des nanoparticules sont : optiques, électriques, catalytiques, thermiques, magnétiques, mécaniques ou encore biologiques.

Nous allons présenter quelques unes de ces propriétés afin d'expliquer l'intérêt que présentent les nanoparticules mais aussi l'origine des interrogations sur leur éventuelle toxicité. Les propriétés optiques des nanoparticules sont connues depuis le 9^{ème} siècle en Mésopotamie. Les artisans utilisaient en effet des nanoparticules pour donner un aspect brillant à leur poterie. Cette technique, conservée au Moyen Age puis à la Renaissance, était basée sur l'utilisation de sels métalliques (notamment de cuivre et d'argent) qui, mélangés à de l'argile puis placés dans une atmosphère réductrice, migraient à la surface de la poterie pour finalement être réduites dans leur état fondamental métallique et former des nanoparticules de cuivre et d'argent à l'origine de l'effet brillant (lustre), Figure 3 ; (Padovani *et al.*, 2003, Pradell *et al.*, 2008). Par la suite, les premières suspensions de nanoparticules étudiées scientifiquement sont attribuées à Faraday (1847). Il établit le lien entre les couleurs (doré, bleu, noir ou encore rouge vif) de solutions de particules d'or (appelées « sols » d'or) et leur taille. Cette propriété était depuis longtemps exploitée pour donner leurs couleurs vives aux vitraux. Certaines nanoparticules d'oxydes métalliques ont également la particularité d'absorber dans les UV. Les nanoparticules de ZnO et TiO_2 sont notamment utilisées dans les produits cosmétiques (crèmes solaires) car ils représentent une bonne protection contre les UV tout en ayant l'avantage d'être transparents (car les nanoparticules ont des dimensions inférieures aux longueurs d'onde de la lumière visible 400-700 nm). L'exposition aux nanoparticules est donc déjà bien réelle.

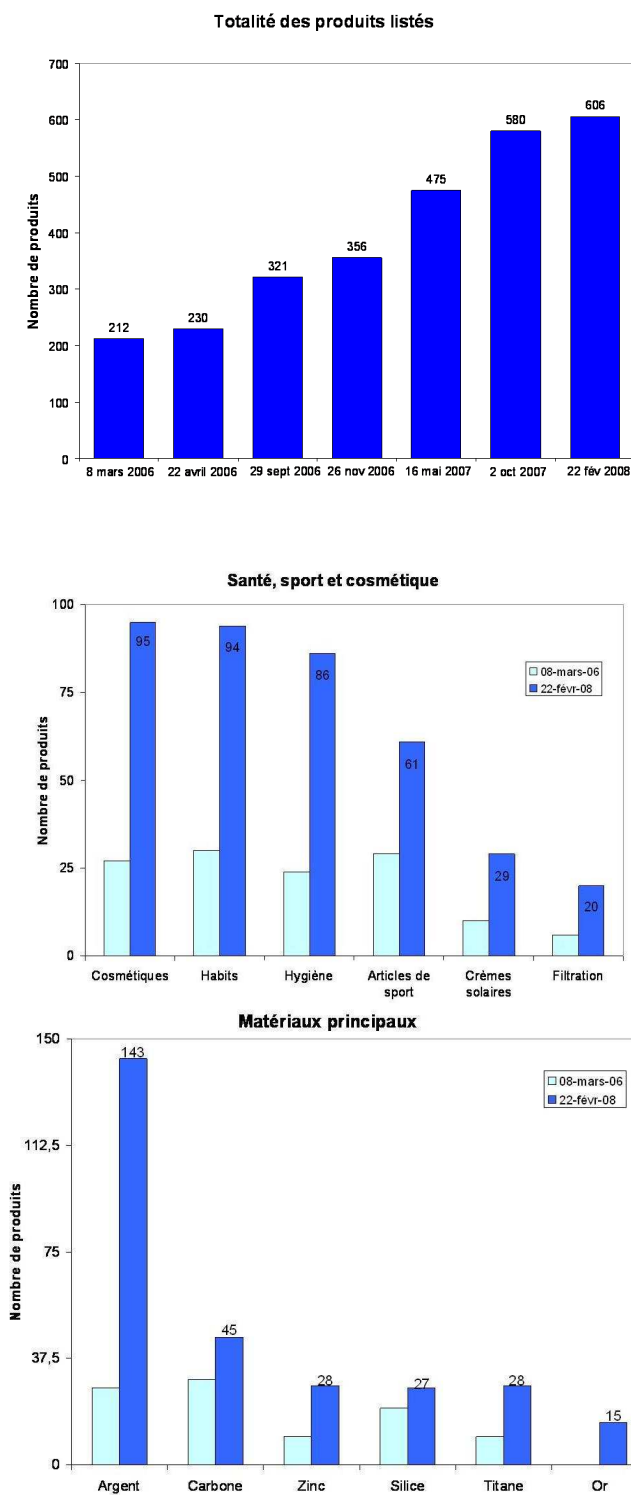


Figure 4 Nombre de produits utilisant des nanotechnologies répertoriés par le PEN (project on emerging nanotechnologies).

De haut en bas : totalité des produits commercialisés contenant des nanotechnologies, sous-catégorie de produits : santé, sport et cosmétique, et les composés principaux des nanotechnologies.

Les nanoparticules possèdent également des propriétés électriques particulières. L'ajout de nanotubes de carbone à des matrices composites (ex : Al_2O_3 , Zhan *et al.*, 2003a, Zhan *et al.*, 2003b) augmente par exemple très significativement la conductivité du matériau. Ces propriétés, dues à la proximité de leurs niveaux d'énergie occupés et vacants (confinement quantique), font d'elles des candidates idéales pour la catalyse (Kamat, 2002). C'est par exemple le cas pour les nanoparticules de TiO_2 , ZnO et CeO_2 ; elles sont incorporées à des surfaces pour leur donner des qualités « autonettoyantes ». Des industries très variées les emploient à ces fins aussi bien dans le bâtiment que le textile (Qi *et al.*, 2006 et Vigneshwaran *et al.*, 2006). Les nanoparticules de CeO_2 peuvent par ailleurs changer facilement de degré d'oxydation et constituer ainsi des pièges à oxygène et radicaux libres (voir chapitre II.2.1.). La pertinence du choix de l'oxyde de cérium dans ce travail trouve ici une première démonstration.

Les propriétés mécaniques des nanoparticules sont également impressionnantes. Elles s'étendent de la superplasticité (ex : matériau constitué de cuivre nanocristallin, (Lu *et al.*, 2000) à des résistances décuplées (ex : renforcement de matrices par des nanotubes de carbone, (Qi *et al.*, 2003). En effet, la dureté de nanotubes de carbone multiparois peut atteindre celle du diamant.

La petite taille des nanoparticules leur permet d'interagir de façon particulière avec les systèmes biologiques (protéines, membranes, cellules). L'utilisation des nanoparticules à des fins thérapeutiques a été envisagée il y a déjà une vingtaine d'années et continue de susciter des recherches actives dans ce domaine notamment dans la libération contrôlée de médicaments (Couvreur and Puisieux, 1993 et Moghimi *et al.*, 2005) ou l'amélioration des techniques d'imagerie médicale (Gao *et al.*, 2004 et Bertorelle *et al.*, 2006). Cependant, une utilisation courante des nanoparticules pour des applications de diagnostic, d'imagerie, voire curatives ne sera envisageable qu'une fois que l'innocuité des nanoparticules aura été vérifiée par des tests de toxicité menés en amont.

I.1.2 Impact des nanotechnologies sur l'économie

Les nanotechnologies présentent, grâce à leurs propriétés particulières, un large spectre d'applications. D'après une estimation de la communauté européenne, le revenu mondial généré par les nanotechnologies était supérieur à 40 milliards d'euros en 2001 (Figure 4).

Santé et beauté	Electronique et informatique	Maison et jardin	Aliments et boissons	Autres
Pansements	Ecran d'ordinateur	Peinture	Revêtement antiadhérence pour poêle	Revêtements
Tests de grossesse				
Dentifrice	Jeux	Oreillers antibactériens	Réfrigérateurs antibactériens	Lubrifiants
Club de golf				
Raquette de tennis	Matériel informatique	Coussins autonettoyants	Huile de canola	
Skis				
Chaussettes antibactériennes				
Habits autonettoyants				
Cosmétiques				
Filtre à air				
Crème solaire				

Tableau 1 Exemples de produits utilisant des nanotechnologies et des nanomatériaux. (Source : Woodrow Wilson Consumer Products Inventory)

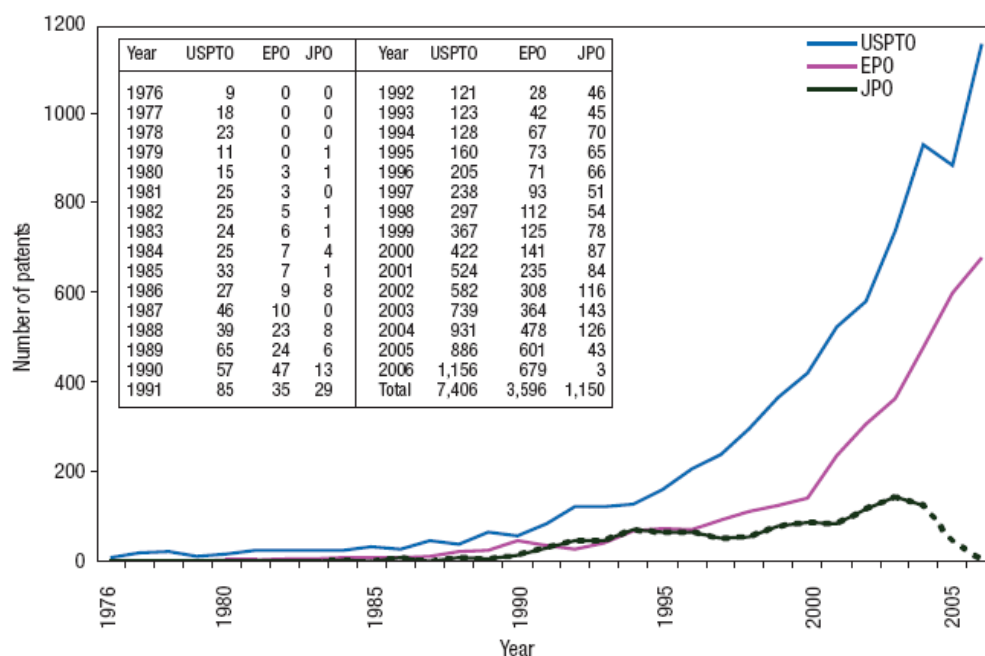


Figure 5 Nombre de brevets publiés par le bureau américain (USPTO), européen (EPO) et japonais (JPO) de 1976 à 2006. (Chen 2008)

Il devrait atteindre plus de 700 milliards d'euros en 2008 et jusqu'à 1000 milliards d'euros par an en 2010-2015, ce qui représente 34 % de l'impact économique global. Les impacts économiques les plus importants des nanotechnologies se situent, sans surprise, dans le domaine des nanomatériaux (34 %), puis dans l'électronique (30 %) et dans la pharmaceutique (18 %) (rapport Affsset 2006). Cependant, de nombreux secteurs industriels sont concernés par le développement des nanomatériaux : l'environnement, l'énergie, le textile, la chimie des matériaux, les cosmétiques, la santé, l'automobile, l'aéronautique et le spatial, l'électronique et les communications, l'industrie du verre, des céramiques et des matériaux de construction, le caoutchouc, la métallurgie et la défense.

Le projet sur les nanotechnologies émergentes (PEN : Project on Emerging Nanotechnologies, www.nanotechproject.org/) répertorie en effet plus de 600 produits déjà commercialisés utilisant des nanotechnologies (Tableau 1). Une partie de ces produits est listée dans le rapport de l'Afsset. On peut par exemple citer les produits à base de :

- Oxyde de cérium : catalyseurs automobiles (Oxonica® Ltd),
- Oxyde de titane : revêtements antipollution et autonettoyants (Shenzen Become Industry and Trade Co., Ltd) et anti-UV dans une crème solaire (ColorScience®)
- Oxyde d'aluminium : nettoyant ménager (Lion® Corporation)
- Oxyde de silicium : cosmétiques de soin pour la peau (Lancôme®)
- Nanoparticules d'argent : vêtements antimicrobiens (Smith & Nephew), savons purifiants (GNS Nanogist)
- Nanotubes : amélioration des performances de raquettes (Yonex®, Babolat®)
- Fullerènes : soin anti âge (Vitamin C60 BioResearch Corporation)
- Titane : clubs de golf à qualité structurale améliorée (Maruman® & Co., Ltd.).

Des bases de données des fournisseurs de nanomatériaux sont également fréquemment mises à jour sur le net (ex : <http://nanowerk.com>).

De plus, l'importance des nanoparticules dans l'économie se traduit aussi par une augmentation fulgurante du nombre de brevets déposés en une vingtaine d'années (Figure 5). Les brevets américains arrivent largement en tête (Chen *et al.*, 2008), mais la France est au premier rang des dépôts de brevets européens (Huang *et al.*, 2003).

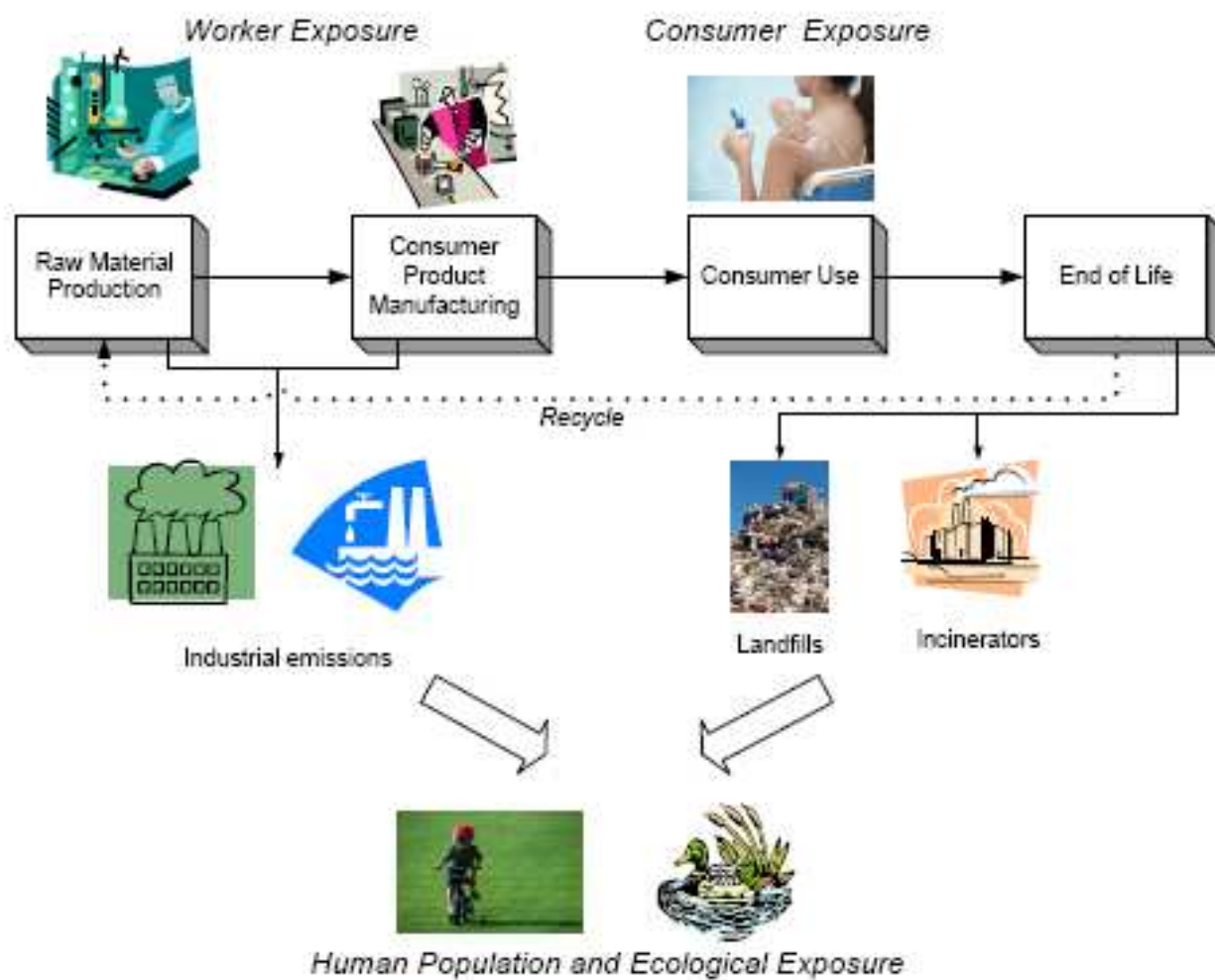


Figure 6 Illustration du cycle de vie des nanoparticules et des risques engendrés. (Source : Agence américaine de protection de l'environnement, EPA)

I.2 Risques potentiels des nanotechnologies

I.2.1 Bases d'une réflexion scientifique

Parmi les impacts potentiels des nanomatériaux sur le monde de demain, l'interaction avec le vivant constitue une interrogation majeure car les propriétés particulières aux nanoparticules, qui les rendent si intéressantes, peuvent potentiellement représenter un danger non négligeable pour les hommes et l'environnement. En effet, si certaines de leurs caractéristiques sont prometteuses pour le traitement de maladies ou l'élaboration de systèmes à libération contrôlée, elles pourraient avoir des impacts inattendus dans d'autres circonstances. La petite taille des nanoparticules pourrait par exemple leur permettre de pénétrer dans les tissus et passer la membrane cellulaire. Une fois dans la cellule, leurs propriétés catalytiques pourraient générer des espèces radicalaires (ROS : Radical Oxygen Species) et causer de sérieuses altérations dans l'ADN (ce qui constituerait un fâcheux effet secondaire de l'utilisation des crèmes solaires). Les nanoparticules sont également suspectées de pouvoir franchir la barrière hémato-encéphalique, or les conséquences de leur accumulation dans le cerveau ne sont pas encore connues. De plus, il existe un risque non négligeable de toxicité par inhalation tout particulièrement pour les personnes travaillant dans des industries fabriquant des nanoparticules. Le nez est la première barrière aux particules, malheureusement seules les plus grosses d'entre elles y sont arrêtées. Les nanoparticules ultrafines et les nanotubes de carbone pourraient donc s'accumuler dans les poumons et y provoquer des effets délétères comparables à ceux observés dans le cas de l'amiante. En ce qui concerne l'environnement, la libération incontrôlée de nanoparticules (ex : combustion des fiouls, ruissellement des nanoparticules utilisées dans les façades autonettoyantes) pourrait avoir de graves conséquences environnementales. Certaines nanoparticules sont même envisagées pour des utilisations en dépollution par exemple pour le piégeage des halogénures, arsenic, mercure, etc. (Elliott and Zhang, 2001 et Tratnyek and Johnson, 2006), leur présence dans l'environnement, notamment aquatique, ne serait donc pas anecdotique (Figure 6).

Il est cependant possible que la plupart des nanoparticules ne représente pas un réel danger pour l'homme et l'environnement, mais en l'absence de données toxicologiques précises et spécifiques, le principe de précaution doit être appliqué.

I.2.2 Conséquences : de nombreux débats de sociétés et rapports gouvernementaux

Faisant suite aux nombreuses interrogations et craintes sur la sécurité des nanomatériaux, relayées à la fois par les scientifiques et les consommateurs, de nombreux rapports d'agences gouvernementales et non gouvernementales ont vu le jour. On peut tout d'abord citer le rapport de la Royal Society publié en 2004 : « Nanosciences and nanotechnologies : opportunities and uncertainties », ainsi que le rapport européen, issu du programme Nanosafe, « Technological Analysis, Industrial application of nanomaterials – chances and risks ». La même année, l'EPA (agence américaine de protection de l'environnement) organisa un premier atelier de travail sur le sujet. En 2005, sont publiés le « Canadian Stewardship Practices of Environmental Nanotechnology » et un rapport du gouvernement britannique intitulé « Characterising the potential risks posed by engineered nanoparticles ». Cette année là a également eu lieu un atelier de travail de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) sur la sûreté des nanomatériaux manufacturés. Puis l'Afsset a publié en juillet 2006 « Les nanomatériaux : effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement ». En février 2007 l'EPA a mis en ligne « Nanotechnology White Papers » et depuis les ateliers sur le sujet se multiplient (OCDE : 2007 et 2008). Dans leur multitude, ces rapports sont néanmoins agencés de manière à peu près identique :

- Définitions, caractérisations et propriétés des nanomatériaux
- Applications industrielles
- Méthodes de productions
- Techniques de détection
- Etudes des risques (exposition) pour les humains et l'environnement
- Gestion des risques (prévention)
- Recommandations et listes des projets de recherche financés sur le sujet.

Ils éliminent également l'argument simpliste qui consiste à affirmer que le principal danger des nanoparticules réside dans leur invisibilité. Tout d'abord car beaucoup de toxiques en solution sont invisibles (ex : métaux lourds, cyanure, arsenic...), mais également parce qu'il existe des méthodes adaptées à la visualisation de nanoobjets (microscopes électroniques à effet tunnel ; microscopie électronique à transmission) ou à leur caractérisation (diffusion de

lumière, diffusion des rayons X). En ce qui concerne la détection de nanoparticules dans l'air, le rapport de l'Afsset répertorie et commente les différentes méthodes analytiques actuellement sur le marché (exemple pour la mesure de distribution en taille : batteries de diffusion, analyseurs par impaction électrique, analyseurs de mobilité électrique).

Les débats publics ne sont pas non plus en reste. En se limitant uniquement à la France, les nanotechnologies et leurs utilisations et dangers potentiels ont déjà fait l'objet de nombreuses attentions ces trois dernières années. On peut notamment citer plusieurs manifestations qui leur ont été entièrement dédiées: une émission de radio grand public (France Inter), une émission de télévision (Direct 8), une exposition grand public sur le nanomonde (citée des Sciences), un débat national citoyen (avec l'intervention d'experts et de consommateurs), un débat organisé par la mairie de Paris (réunissant des experts et des opposants) ainsi qu'un café philosophique (VivAgora). Cette liste n'est pas exhaustive mais elle est représentative d'une réelle prise de conscience de l'enjeu des nanotechnologies et d'une mobilisation qui touche aussi bien les pouvoirs publics que les citoyens.

Le nombre et la qualité des rapports, ateliers et conférences est la preuve que ce sujet est au cœur d'un débat mondial de société. Chaque commission, chaque rapport, s'applique à trouver des stratégies communes d'évaluation des risques. Les conclusions demeurent finalement similaires : ils préconisent le financement de programmes de recherche sur le sujet et l'application du principe de précaution en cas d'incertitude. En effet, la méthodologie des tests de toxicité spécifiques aux nanoparticules reste encore à développer.

I.3 Etudes sur la « nanotoxicité » et difficultés rencontrées

I.3.1 Origine des difficultés liées à la « nanotoxicité »

Il n'existe aucune réglementation spécifiquement liée à la synthèse et manipulation des nanoparticules. Les industriels travaillant actuellement sur ce type de composés ont généralement deux attitudes opposées : soit ils utilisent les données de sécurité des matériaux dont sont faites les nanoparticules sans plus de considération pour leurs caractéristiques particulières ; soit ils considèrent les nanoparticules comme des substances potentiellement dangereuses et les manipulent avec les équipements classiques de sécurité (qui ne sont

cependant pas toujours adaptés). Pourquoi n'existe-t-il aucune donnée officielle relative à la toxicité des nanomatériaux ? Premièrement parce que sur l'ensemble des substances présentes sur le marché, peu d'entre elles ont réellement été testées in-vitro et in-vivo dans des conditions adaptées. En effet, d'après André Neal, sur les 80 000 produits chimiques enregistrés sur le marché américain, seuls 530 ont subis des tests sur la toxicité à court terme, et seulement 70 sur la toxicité à long terme (Neal, 2008). De plus, les procédés d'évaluation des toxiques dits « classiques » ne s'appliquent pas aux nanoparticules. En effet, l'or est, par exemple, connu pour être un métal inerte mais les nanoparticules d'or sont loin de l'être : lorsque leur taille diminue, elles deviennent des réducteurs puissants. C'est pourquoi dans le cas des nanoparticules il est nécessaire de prendre en compte certains paramètres spécifiques, qui sont totalement absents des tests de toxicité classiques. Ces paramètres sont principalement des paramètres physicochimiques. Ils sont résumés dans le tableau suivant :

Taille	Taille
	Surface spécifique
	Distribution en taille
Forme	Forme
Composition chimique	Composition chimique
	Pureté
	Structure cristalline
	Propriétés électroniques
Structure de surface	Réactivité de surface
	Fonctions chimiques en surface
	Recouvrement inorganique ou organique
	Porosité
Stabilité physicochimique	Solubilité
	Agrégation

On peut noter que certains de ces paramètres sont interdépendants (ex : taille et solubilité). Une fois ces paramètres connus, il faut aussi prendre en compte ceux, plus classiques, mais non moins importants, des tests de toxicité in-vitro et in-vivo à savoir :

	unit	nano-Ag		nano-TiO ₂		CNT	
		RE	HE	RE	HE	RE	HE
air	$\mu\text{g m}^{-3}$	1.7×10^{-3}	4.4×10^{-3}	1.5×10^{-3}	4.2×10^{-2}	1.5×10^{-3}	2.3×10^{-3}
water	$\mu\text{g L}^{-1}$	0.03	0.08	0.7	16	0.0005	0.0008
soil	$\mu\text{g kg}^{-1}$	0.02	0.1	0.4	4.8	0.01	0.02

^a RE: realistic scenario; HE: high emission scenario.

Tableau 2 Exemples de prédiction des concentrations environnementales en nanoparticules d'argent, d'oxyde de titane et de fullerènes dans l'air, l'eau et le sol.

RE : Estimation réaliste, HE : Estimation en cas de fortes émissions (Mueller 2008)

- la dose testée
- la durée d'exposition
- la voie d'administration
- la cible biologique
- la composition de l'environnement dans lequel a eu lieu l'exposition.

La complexité de la matrice des paramètres éclaire la difficulté à obtenir des données standardisées pour l'ensemble des nanoparticules. Si l'on considère que chaque test de toxicité doit être réalisé au cas par cas, cela représenterait une quantité énorme de tests et engendrerait des coûts colossaux. La toxicité des nanoparticules ne peut cependant pas être simplement extrapolée à partir d'autres systèmes déjà étudiés. En effet, les résultats de toxicité obtenus pour les particules ultrafines (PUF) ne sont pas automatiquement transposables aux nanoparticules puisqu'elles se présentent sous forme d'aérosols hétérogènes en taille et en polydispersités et que le contact avec les cellules pulmonaires s'effectue directement dans le milieu de dispersion des PUF. A contrario, les nanoparticules, qu'elles soient synthétisées par voie liquide ou par voie gazeuse, doivent subir un changement de milieu au moment du contact avec les cellules pulmonaires, ce qui peut entraîner une perte de stabilité et des interactions nanoparticules-cellules différentes (Colvin, 2003).

I.3.2 Particularités de la toxicité environnementale

Dans un passé récent, les ateliers de recherche de l'EPA avaient mis en évidence des lacunes dans les données nécessaires à une évaluation des risques environnementaux. Elles étaient résumées en trois interrogations : quelles quantités et quels types de nanoparticules sont produits dans l'industrie ? A quelles doses un travailleur est-il susceptible d'être confronté ? Quelle est la voie la plus probable d'exposition ? De nombreux rapports tendent aujourd'hui à répondre de plus en plus précisément à ces questions. Il reste néanmoins encore des interrogations notamment sur les doses à tester sur les modèles environnementaux. En effet, ces études étant préventives, il n'existe à ce jour aucune base de données sur les quantités de nanoparticules qui seraient potentiellement libérées dans l'environnement. Quelques études prédictives ont été réalisées sur la base de la production actuelle de nanoparticules (par exemple pour TiO_2 comme présenté dans le Tableau 2, Mueller and Nowack, 2008) ou encore en extrapolant des mesures réalisées dans l'environnement pour CeO_2 (Park *et al.*, 2008). De plus, il est également possible de faire une distinction entre les nanomatériaux dispersés

(exemple d'applications : cosmétiques, lessives, médicaments) et non dispersés (utilisés dans les traitements de surface). Les nanoparticules dispersées ont potentiellement beaucoup plus de chance d'être retrouvées dans l'environnement. L'état de leur recouvrement de surface sera déterminant et pourra, selon le contexte, induire une augmentation ou une diminution de la toxicité (Reijnders, 2006). Dans le cas où les nanoparticules sont sous forme non dispersée, elles peuvent se retrouver dans l'environnement après avoir été détachées de leurs supports ou matrices par une utilisation répétée, l'érosion, la corrosion ou un nettoyage (ex : 60 % des nanoparticules d'argent contenues dans les tissus sont perdues après 20 lavages, Reijnders, 2006).

Une nouvelle catégorie de chercheurs spécialisés dans la « nanotoxicité » a vu le jour. Plusieurs revues publiées par certains d'entre eux mettent en exergue les précautions et recommandations à prendre en compte dans ce type d'études. On peut notamment citer : Hochella, 2002 ; Colvin, 2003 ; Dreher, 2004 ; Oberdörster *et al.*, 2005 ; Reijnders, 2006 ; Barnard, 2006 ; Maynard, 2006 ; Kuzma, 2007 ; Kandlikar *et al.*, 2007 et Neal, 2008. Ils insistent néanmoins sur le fait de considérer avec prudence toute tentative d'uniformisation des protocoles sans une compréhension préalable profonde des paramètres mis en jeu (Colvin, 2003 et Nel *et al.*, 2006).

I.4 Présentation de l'étude

I.4.1 Description du modèle

Le choix d'un modèle est une tâche difficile. En effet, il doit être à la fois adapté aux exigences des protocoles expérimentaux, capable de répondre à la problématique fondamentale posée et cohérent d'un point de vue environnemental. Plusieurs aspects du modèle seront successivement discutés : le type de nanoparticules étudiées, le choix du milieu de contact, la cible biologique, et les durées d'exposition et doses appliquées.

I.4.1.1 Choix des nanoparticules

Il existe une grande diversité de nanoparticules déjà commercialisées qu'il serait intéressant de tester. Dans cette étude nous avons choisi de nous consacrer plus particulièrement aux nanoparticules d'oxyde de cérium (CeO_2). Ces nanoparticules, dont les caractéristiques seront

décrites dans le chapitre II.2.2., ont été choisies pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elles se présentent spontanément sous forme d'une dispersion stable de nanoparticules de 7 nm lorsqu'elles sont dans l'eau. Cette stabilité ne nécessite l'ajout d'aucun composant additionnel de type tensioactif ou polymère qui pourrait également interagir avec la cible biologique. Ce sont donc des nanoparticules adaptées à une étude fondamentale sur la compréhension des interactions purement dues aux nanoparticules. En outre, elles sont de plus en plus largement utilisées (et envisagées) dans de nombreux produits commerciaux (voir chapitre II) et notamment comme additifs pour le diesel mais aussi dans les cigarettes (AMR Technologies Inc. 2005 et brevets de Philip Morris USA, Inc.). A priori, leur utilisation va tendre à se développer fortement dans les 10 prochaines années. Leur concentration dans les nappes phréatiques et les sols augmentera alors également.

Il existe différentes voies de libération des nanoparticules dans l'environnement. Si les nanoparticules se présentent sous forme d'aérosols (par exemple les gaz des fumées d'échappement) elles toucheront en premier lieu les voies respiratoires et les muqueuses. Les risques engendrés par une inhalation de nanoparticules de CeO_2 ont été évalués sur des modèles cellulaires (Limbach *et al.*, 2005) et sur des modèles animaux (Park *et al.*, 2008) . Nous les commenterons plus tard. Cependant, les particules ne sont pas stables dans l'air à long terme car la gravité et les précipitations atmosphériques les entraînent inévitablement dans l'eau et les sols.

I.4.1.2 Choix du milieu liquide

Nous avons choisi d'étudier les interactions entre bactéries et nanoparticules dans un milieu liquide. En effet, l'eau et l'air sont les transporteurs les plus classiques des polluants dans l'environnement. Hommes, plantes, animaux et bactéries dépendent de l'eau et sont directement touchés par les toxiques qu'elle contient en cas de contamination. En outre, c'est dans l'eau que la plupart des substances montrent leur principal impact sur l'environnement. Elles peuvent y être transformées, dégradées ou accumulées de diverses manières (Colvin, 2003). Nous ne disposons pas encore de données précises sur les concentrations en nanoparticules de CeO_2 dans l'eau, cependant, des études prédisent une concentration de nanoparticules d'oxydes de TiO_2 plus importante dans l'eau que dans les autres milieux (Mueller and Nowack, 2008). Si ce résultat est extrapolable aux nanoparticules de CeO_2 , il confirme encore une fois la cohérence d'un modèle où le contact a lieu dans l'eau.

Dans cette étude nous avons choisi trois milieux liquides pour la mise en contact :

- le milieu de culture : milieu optimum et connu pour les cellules mais pouvant potentiellement interagir avec les nanoparticules lors des tests,
- l'eau synthétique modérément dure : une des eaux recommandées par l'EPA (l'agence américaine de protection de l'environnement). Ce milieu se rapproche des conditions environnementales. Moins riche que le milieu de culture de laboratoire, elle contient cependant plus d'ions que l'eau ultrapure et est donc moins défavorable aux cellules, et,
- l'eau ultrapure : milieu peu favorable aux cellules mais permettant une compréhension fondamentale des interactions mises en jeu.

L'eau naturelle est un modèle environnemental adapté mais elle nécessite d'en connaître sa composition exacte. En effet, il existe une très grande variété d'eaux sur Terre et leurs compositions, très diverses, ont un impact crucial sur les conditions de vie de la flore et de la faune environnantes. Il n'est évidemment pas possible de les tester dans leur intégralité, de plus elles varient selon les conditions environnementales (précipitations, température, etc.). Pour pallier à cet inconvénient, l'EPA (l'agence américaine de protection de l'environnement) a établi la liste des eaux synthétiques « modèles » (douce, moyennement dure, dure...) et les protocoles de préparation qui leur correspondent. Ceci permet aux toxicologues d'avoir une base commune de milieux tests pour comparer leurs résultats.

Notons également que de nombreuses études sont réalisées dans des milieux de culture de laboratoire (ex : de bactéries ou cellules humaines), ces derniers ne sont pas représentatifs d'un milieu environnemental naturel. En effet, ce sont des milieux optimaux pour le développement des cultures, c'est-à-dire riches en nutriments ou/et minéraux (parfois même antibiotiques) qui peuvent interférer avec les toxiques testés. Ils sont toutefois intéressants à étudier car la biologie des cellules y est en général parfaitement connue et maîtrisée. Il est donc plus aisé de comparer l'impact de différents toxiques.

I.4.1.3 Choix des organismes modèles

Potentiellement, une grande variété d'organismes biologiques pourrait être la cible des nanoparticules. Lorsque la toxicité étudiée est une toxicité par voies aériennes, les études sont

en général basées sur des animaux (ex : rats, souris) et quelques fois sur des humains (ex : effet des nanoparticules émises par le diesel). Elles nécessitent un grand nombre d'individus pour être représentatives et sont, de ce fait, extrêmement coûteuses. Elles peuvent également être réalisées directement sur les cellules pulmonaires, mais donnent, dans ce cas, des informations limitées au contact direct entre les nanoparticules et la cellule. Elles ne fournissent aucune donnée sur l'arrivée effective des nanoparticules jusqu'aux alvéoles pulmonaires, ni sur leur état d'agrégation et de surface au moment du contact avec la cellule. De même, il est difficile, à partir de données toxicologiques réduites à l'étude de cellules du derme, de conclure quant à une toxicité par voie cutanée. Il faudrait préalablement vérifier la pénétration des nanoparticules dans les couches supérieures de l'épiderme. Ceci nécessite des coupes de peau en bon état (ce qui est coûteux), et dépend de plus fortement des tensioactifs utilisés pour stabiliser les nanoparticules. Ils sont en effet déterminants lors de la pénétration cutanée.

Notre étude étant à visée environnementale, nous avons choisi une cyanobactérie, *Synechocystis*, et une bactérie, *Escherichia coli*, comme modèles biologiques cibles. *Synechocystis* appartient à la famille des cyanobactéries. Son petit génome entièrement séquencé fait également d'elle un modèle d'étude bien connu au laboratoire. De plus, les cyanobactéries font partie du phytoplancton. Elles fournissent de ce fait une grande partie de la biomasse aquatique et jouent un rôle important dans le maintien de la biosphère. *Escherichia coli*, quant à elle, est une bactérie d'origine intestinale, bien connue par les biologistes car elle sert souvent d'organisme modèle. En effet, son génome est entièrement connu et séquencé et elle est l'outil de prédilection des biologistes moléculaires. Présente au cours de sa vie, dans les intestins des mammifères puis dans l'environnement, elle est adaptable à des conditions de vie (pH, salinité) variées.

Ces deux organismes sont donc largement représentés dans l'environnement et particulièrement dans l'eau. Premier maillon de la chaîne alimentaire aquatique, ils constituent la porte d'entrée des toxiques dans le monde animal notamment par des phénomènes de bioaccumulation. Fréquemment observée dans le cas des métaux lourds, la bioaccumulation est la capacité d'une substance, peu dégradable et peu métabolisable, à s'accumuler dans un organisme. Elle s'accroît tout au long de la chaîne alimentaire, les prédateurs en bout de chaînes alimentaires sont donc ceux qui seront les plus touchés. On comprend de ce fait pourquoi une toxicité des nanoparticules vis-à-vis des (cyano)bactéries

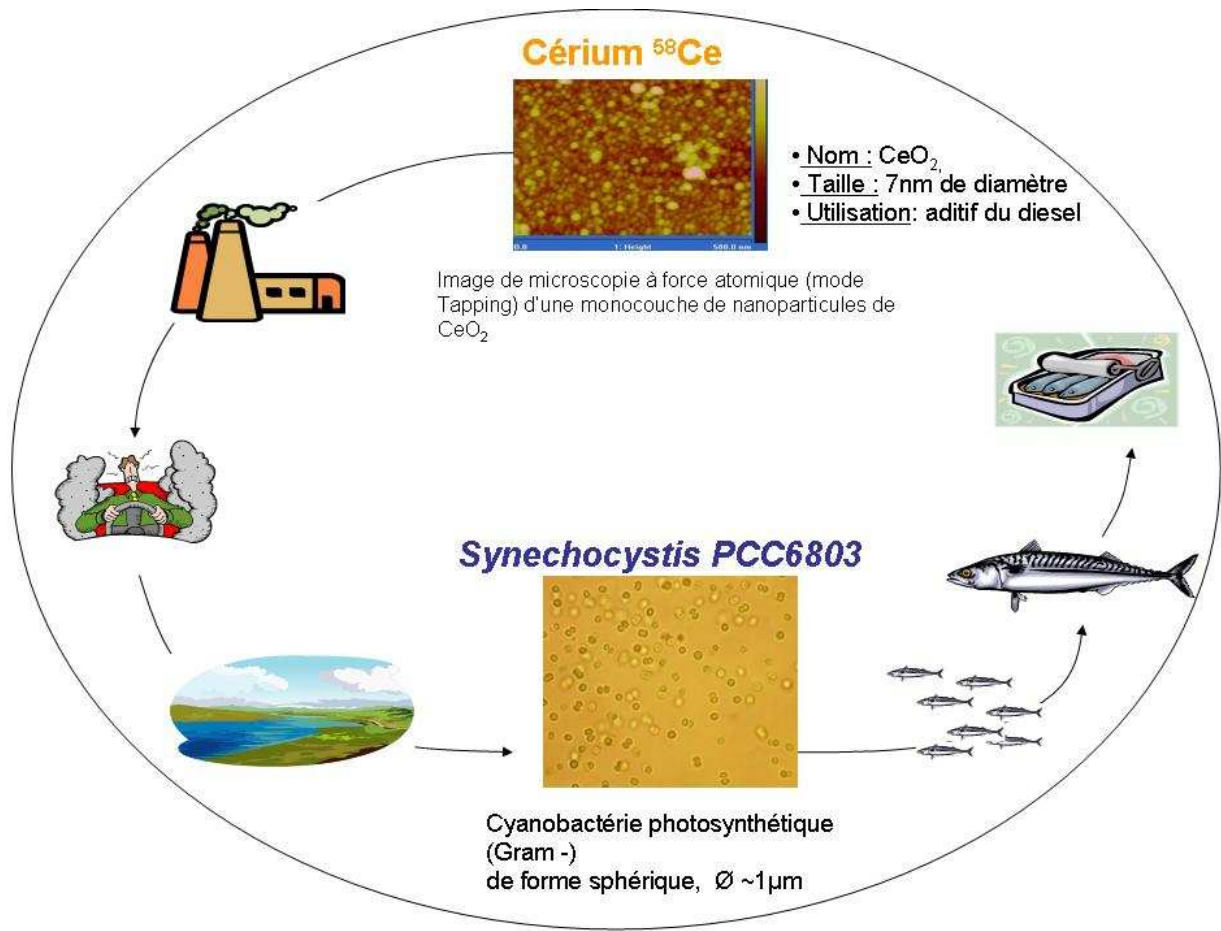


Figure 7 Choix du modèle d'étude : cycle de vie de nanoparticules de CeO_2 et impact environnemental potentiel.

aura un impact indirect, à plus ou moins long terme, sur toute la chaîne alimentaire ; chaîne alimentaire dont nous faisons partie (Figure 7).

I.4.1.4 Choix de la dose et du temps d'incubation

La dose administrée et le temps d'incubation sont des paramètres fondamentaux lors des tests de toxicité. Ils sont difficiles à choisir lorsqu'il n'existe encore aucune donnée sur les concentrations environnementales et donc sur une exposition éventuelle. D'après le profil chimique de l'oxyde de cérium, établi en 2006 par Integrated Laboratory Systems pour différents instituts de santé européens, il n'existe aucune donnée sur la concentration des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau. Ils estiment cependant que les sources et voies de libération des nanoparticules dans l'environnement sont similaires à celles du CeO_2 non nanométrique. D'après ce rapport, la concentration des terres rares (dont le cérium fait partie) ne dépasse pas le ng/L dans les eaux de surface. En revanche, jusqu'à 1,7 ppm de cérium ont été retrouvés dans des eaux souterraines contaminées par une fuite d'eaux usées rejetées par une mine en Californie. Au Japon, 35,4 ppm de cérium ont été retrouvés en 2001 dans des boues d'épuration. Aucune trace de cérium n'a cependant été trouvée dans les boues de stations d'épuration américaines jusqu'à présent. D'après les mesures réalisées par Park *et al.* (2008), l'air ambiant, à proximité de zones urbaines utilisant des additifs diesel aux nanoparticules de CeO_2 , contient dans le pire des cas mesurés (Newcastle) 0,6 ng de cérium par m^3 d'air. Ce sont des concentrations extrêmement faibles mais qui ne sont pas forcément en rapport avec les concentrations trouvées dans l'eau. Malgré le manque d'informations sur les risques d'exposition réels, nous considérerons principalement dans cette étude des concentrations inférieures ou égales à 700 ppm de CeO_2 . Ces concentrations surestiment, a priori, très largement les concentrations attendues dans l'environnement. Nous restreindrons, dans certain cas, les intervalles de concentrations testées pour nous consacrer à la compréhension des phénomènes aux plus faibles doses.

En ce qui concerne les temps d'incubation, étant donné que la majorité des tests ont été effectués dans l'eau ultrapure et que les bactéries ne peuvent pas y supporter un séjour prolongé, les temps d'incubation seront limités à 3 h. En effet, pour des temps plus longs, le nombre de cellules viables dans les témoins chute de manière trop importante. Les tests réalisés dans les milieux de culture ont été réalisés après 3 h mais également 24 h d'incubation.

I.4.2 Les études de nanotoxicité appliquées aux bactéries

Avant de commencer à commenter notre étude, nous allons établir une revue rapide des études qui ont été réalisées à ce jour sur des systèmes proches du nôtre. Les mises en contact (milieu solide, liquide), les tests de toxicité (comptage de colonies, croissance, perméabilité membranaire...), le type de nanoparticules (taille, forme, dispersant) et les bactéries diffèrent selon les auteurs. Cette diversité rend la comparaison difficile, nous allons cependant tenter d'en extraire des conclusions générales pour les nanoparticules suivantes : oxydes de zinc, oxydes de titane, argent, or et oxyde de cérium.

La toxicité des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) a été étudiée à la fois en milieu solide, le contact avec les bactéries s'effectuant sur milieu gélosé (Huang *et al.*, 2008 et Reddy *et al.*, 2007), et en milieu liquide (Brayner *et al.*, 2006, Franklin *et al.*, 2007, Reddy *et al.*, 2007, et Zhang *et al.*, 2007). Les nanoparticules de ZnO étant également envisagées pour des applications textiles (coton autonettoyant), certains tests ont été réalisés par immersion de tissus imprégnés de nanoparticules dans de l'eau ultrapure avec les bactéries (Vigneshwaran *et al.*, 2006). De même que pour les nanoparticules de ZnO, les nanoparticules de TiO₂ sont étudiées pour leur effet bactéricide sous différentes formes : en suspension liquide (Joo *et al.*, 2005 et Verran *et al.*, 2007), en dispersion sur milieu gélosé (Adams *et al.*, 2006), adsorbées sur des fibres de coton (Daoud *et al.*, 2005 et Qi *et al.*, 2006) ou bien encore sur des couches minces fonctionnalisées pour un effet bactéricide (Elahifard *et al.*, 2007, Kiwi and Nadochenko, 2005 et Sunada *et al.*, 2003). Nous avons déjà ici un aperçu de la multiplicité des protocoles appliqués dans ce type d'étude et la difficulté qu'elle engendre pour comparer les résultats.

I.4.2.1 Présence de nanoparticules intra- et extracellulaires

Huang *et al.*, 2008, et Brayner *et al.*, 2006, observent la présence d'inclusions riches en zinc à l'intérieur de bactéries mises en présence de nanoparticules de ZnO. Celles-ci, de composition cristalline différente de celle des nanoparticules, sont attribuées à une probable dissolution des nanoparticules, puis à l'internalisation et précipitation des ions Zn²⁺ dans les bactéries. En effet, contrairement aux cellules eucaryotes dont la membrane cellulaire est capable d'invagination (endocytose, phagocytose), les canaux ioniques bactériens sont, dans la majorité des cas, trop petits pour permettre une internalisation des nanoparticules

(Moore, 2006). Les pores les plus larges sont ceux utilisés lors de la sécrétion de protéines destinées à la membrane extérieure de la bactérie ou à être libérées dans le milieu de culture.

Ces pores sont théoriquement suffisamment larges pour permettre le passage de nanoparticules de 1-9 nm, mais également la perte du cytoplasme cellulaire. Il est donc probable qu'ils soient fermés et donc inaccessibles aux nanoparticules (Neal, 2008). Certains cas d'internalisation de nanoparticules (d'argent 80 nm) sont cependant observés chez des bactéries traitées aux antibiotiques. Celles-ci sont plus perméables aux nanoparticules que les bactéries non traitées (Xu *et al.*, 2004).

Dans l'environnement, les bactéries sont parfois à l'origine de la formation de nanoparticules « naturelles », intracellulaires ou précipitées sur les polysaccharides extracellulaires. Elles sont en général le résultat d'une détoxification, comme dans le cas des nanoparticules de U, Pb, Cu, Al, Cd (détectées en présence de *Bacillus sphaericus*, Pollmann *et al.*, 2006) ou d'une biominéralisation, (exemple des nanoparticules de silice chez la bactérie *Shewanella oneidensis*, Furukawa and O'Reilly, 2007).

Dans notre cas il sera donc intéressant de rechercher la présence ou non de nanoparticules intracellulaires et, dans le cas positif, vérifier si elles sont dues à une dissolution des nanoparticules.

I.4.2.2 Influence de la taille, dissolution et agrégation des nanoparticules

En milieu solide, la toxicité des nanoparticules de ZnO de 100 nm est très importante pour les fortes concentrations (supérieures à 12 mM) (Huang *et al.*, 2008). Or Brayner *et al.*, 2006, montrent que des nanoparticules de 10-15 nm présentent un effet bactéricide pour *E. coli* à des concentrations nettement plus basses : 1,3 mM. Cependant, d'après Franklin *et al.*, 2007, il n'y a pas d'influence de la taille des nanoparticules, ils observent en effet des toxicités identiques pour des nanoparticules de ZnO de 30 nm que pour des microparticules de ZnO ou pour la forme ionique : ZnCl₂. De même, pour Zhang *et al.*, 2007, la concentration des nanoparticules de ZnO est plus importante que leurs tailles. Les ions Zn²⁺ libérés lors de la dissolution des nanoparticules semblent de nouveau être à l'origine de l'effet bactéricide. Ce phénomène de dissolution est aussi mis en exergue par Franklin *et al.*, 2007. Dans notre cas, les nanoparticules de CeO₂ ne sont pas connues pour être très solubles mais ceci devra être à vérifier.

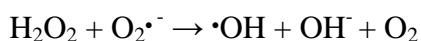
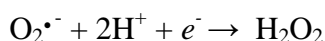
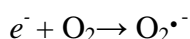
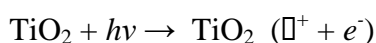
Comme pour les nanoparticules de ZnO, il existe des contradictions quant à l'effet joué par la taille des nanoparticules de TiO₂. Pour Adams *et al.*, 2006, et Verran *et al.*, 2007, elle n'a aucun effet, tandis que pour Qi *et al.*, 2006, la toxicité augmente lorsque la taille diminue. Ces différences proviennent probablement des différences de composition des nanoparticules et des conditions dans lesquelles les tests de toxicité ont été réalisés, les nanoparticules peuvent notamment avoir tendance à s'agréger (Verran *et al.*, 2007).

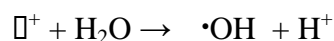
De même, les nanoparticules d'argent s'agrègent dans les électrolytes forts. Par ajout d'albumine de sérum bovin (BSA) l'aggrégation est évitée et l'activité bactéricide conservée (Lok *et al.*, 2007). Sondi and Salopek-Sondi, 2004, observent également que les nanoparticules d'argent métalliques sont toxiques uniquement lorsque le contact a lieu sur un milieu solide contrairement au milieu liquide où ils ne notent qu'un retard de croissance. D'après ces auteurs, l'explication tient à l'aggrégation des nanoparticules d'argent avec les composants intracellulaires des cellules mortes. Une fois les nanoparticules agrégées, elles ne sont plus bactéricides, ce qui permet aux autres bactéries du milieu de se développer normalement. A noter que la présence de peptides et protéines extracellulaires provoquent également la précipitation des nanoparticules (Moreau *et al.*, 2007).

Comme pour la dissolution, l'aggrégation est un type d'instabilité courant pour les nanoparticules, nous l'étudierons lors des tests avec les NPs de CeO₂.

I.4.2.3 Toxicité engendrée par la production d'espèces radicalaires oxydantes (ROS)

Les nanoparticules de TiO₂ présentent systématiquement un effet bactéricide qui, comme celui des nanoparticules de ZnO (Adams *et al.*, 2006), est accru sous l'effet d'une irradiation (Adams *et al.*, 2006 et Daoud *et al.*, 2005). Les nanoparticules sont en général adsorbées sur la paroi cellulaire par des forces électrostatiques. La toxicité serait alors provoquée par la proximité des nanoparticules avec la membrane cellulaire et par la libération de ROS (espèces radicalaires) produites lors des réactions suivantes :





En effet, les ROS générées par l'oxydation des nanoparticules (TiO_2 et ZnO notamment) provoqueraient des réactions radicalaires en chaînes destructrices (peroxydation lipidique) dans la couche de lipopolysaccharides bactériens. Ces derniers résistent par ailleurs moins bien à l'irradiation en présence de TiO_2 que les peptidoglycanes (analyses par ATR-FTIR, Kiwi and Nadtochenko, 2005). Sunada *et al.*, 2003, démontrent notamment qu'il y a destruction de la membrane externe puis interne d'*E. coli* en présence de nanoparticules de TiO_2 .

Dans certains cas, la présence de nanoparticules de fullerènes (Fang *et al.*, 2007) entraîne une modification dans la synthèse des acides gras bactériens. *Pseudomonas putida* diminue la synthèse des acides gras « classiques » au profit d'acides gras cyclopropaniques, tandis que *Bacillus subtilis* synthétise plus d'acides gras monosaturés. Ces modifications sont supposées être induites afin de protéger la membrane cellulaire des ROS. La fluidité membranaire est augmentée dans les deux cas. Des particules de MgO complémentées en Cl_2 (Stoimenov *et al.*, 2002) semblent provoquer également des dommages membranaires importants. Cependant, les étapes de lavages à l'acide chlorhydrique et ascorbique utilisées de façon préliminaire aux observations en microscopie électronique et à force atomique, jouent vraisemblablement un rôle non négligeable sur les altérations observées par les auteurs.

Nous vérifierons donc les mécanismes d'oxydoréduction engendrés lors des interactions nanoparticules-cellules par des techniques analytiques permettant de définir la spéciation des atomes de cérium.

I.4.2.4 Influence de la composition des nanoparticules

Les nanoparticules d'argent sont déjà couramment utilisées pour leurs propriétés bactéricides. Lok *et al.*, 2007, ont cependant démontré que l'état d'oxydation des nanoparticules joue un grand rôle dans leur pouvoir bactéricide. En effet, seules les nanoparticules d'Ag contenant la forme oxydée sont toxiques au contraire des nanoparticules métalliques (de degré d'oxydation nul). La toxicité augmente lorsque la taille des nanoparticules diminue ce qui est directement corrélé avec une augmentation de la fraction d'ions Ag^+ adsorbée en surface des particules. A contrario, les nanoparticules de maghémite (Fe^{3+}) et de magnétite ($\text{Fe}^{3+/2+}$) sont moins bactéricides que les nanoparticules de fer au degré d'oxydation zéro (thèse de Mélanie Auffan 2007). Selon les mêmes auteurs (Auffan *et al.* 2006), les nanoparticules de maghémite stabilisées par un tensioactif (DMSA : acide dimercaptosuccinique) ne montrent aucune

toxicité sur des fibroblastes. Ceci est attribué à la présence du tensioactif qui limite l'interaction électrostatique entre les nanoparticules et la membrane cellulaire.

Des nanobâtonnets d'or fonctionnalisés avec des anticorps bactériens spécifiques et sous irradiation (Norman *et al.*, 2008) montrent une toxicité importante. En revanche, la présence de ces nanobâtonnets d'or non fonctionnalisés et sans irradiation n'a aucun effet toxique sur les mêmes bactéries. L'effet bactéricide nécessite donc une proximité des nanoparticules avec la paroi bactérienne et une activation lumineuse. Notons également, qu'il n'existe pas, à notre connaissance, d'études ayant démontré des différences notables de toxicité bactérienne pour des nanoparticules de composition identique mais de formes différentes.

Dans cette étude, nous testerons notamment l'influence de la présence d'un polymère (l'acide polyacrylique) en surface des nanoparticules de CeO₂ sur la toxicité cellulaire.

I.4.2.5 Comparaison toxicité humaine et bactérienne – cas de l'oxyde de cérium

En ce qui concerne la toxicité des nanoparticules d'oxyde de cérium contenues dans le diesel, elle a été récemment investiguée par Park *et al.*, 2008. Ils ne concluent à aucun effet toxique lors des tests d'irritation de la peau, des tests cytotoxiques sur des cellules épithéliales, et à aucune mutagénèse bactérienne (test de Ames). Selon les mêmes auteurs, à 1000 µM le cérium n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire contrairement aux oxydes de cuivre, de zinc et de titane. En revanche, Limbach *et al.*, 2005, montrent une importante absorption des nanoparticules de CeO₂ dans des fibroblastes. L'absorption est dépendante de la taille des nanoparticules et de leur capacité à former des agrégats qui seront absorbés. L'absorption cellulaire semble dépendre du potentiel zêta des nanoparticules de CeO₂ (Patil *et al.*, 2007). En effet, les nanoparticules de potentiel zêta positif s'adsorbent plus facilement sur la BSA au contraire des nanoparticules chargées négativement qui sont, elles, préférentiellement absorbées par les cellules. Cette absorption ne semble cependant pas néfaste puisque plusieurs publications tendent à démontrer un effet bénéfique des nanoparticules de CeO₂ sur des neurones de rat (Das *et al.*, 2006), des rétines de rat (Chen *et al.*, 2006b) et (Chen *et al.*, 2006a) et des cellules nerveuses (Schubert *et al.*, 2006).

Les publications concernant la toxicité des nanoparticules de CeO₂ sur les bactéries ne sont pas aussi nombreuses et il est impossible d'extrapoler simplement une toxicité ou son absence sur des cellules de mammifères (cellules eucaryotes de 100 µm capable d'endocytose) à une

toxicité bactérienne (cellules procaryotes de 1 μm ne pratiquant pas d'endocytose). Ceci a notamment été montré dans la publication de Reddy *et al.*, 2007, où la toxicité des nanoparticules de ZnO est nettement plus importante pour les bactéries que pour les cellules humaines.

Le but de l'étude qui va suivre est d'investiguer les interactions biologiques et physicochimiques entre nanoparticules et bactéries afin de comprendre les mécanismes de toxicité qu'implique l'échelle du nanomètre. Nous comparerons les résultats obtenus avec la cyanobactérie *Synechocystis* à ceux obtenus avec la bactérie *E. coli* afin d'étudier l'impact du choix du modèle biologique, et ceci dans différents milieux de contact pour une meilleure compréhension des phénomènes susceptibles de se produire dans l'environnement en présence des nanoparticules. Nous prendrons notamment particulièrement en compte les phénomènes susceptibles d'induire une agrégation ou dissolution des nanoparticules, ainsi que leur état d'oxydation lors d'une interaction avec les cellules.

I.5 Références bibliographiques

- [Adams *et al.*, 2006] Adams, L. K., Lyon, L. Y., and Alvarez, P. J. (2006). Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40:3527 – 3532.
- [Auffan *et al.*, 2006] Auffan, M.; Decome, L.; Rose, J.; Orsiere, T.; De Meo, M.; Briois, V.; Chaneac, C.; Olivi, L.; Berge-Lefranc, J.L.; Botta, A.; Wiesner, M.R. and Bottero, J.Y. (2006) In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environmental Science & Technology*, 40: 4367-4373 .
- [Barnard, 2006] Barnard, A. S. (2006). Nanohazards: Knowledge is our first defence. *Nature Materials*, 5(4):245–248.
- [Bertorelle *et al.*, 2006] Bertorelle, F., Wilhelm, C., Roger, J., Gazeau, F., Menager, C., and Cabuil, V. (2006). Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles: Intracellular uptake and use in cellular imaging. *Langmuir*, 22(12):5385–5391.
- [Brayner *et al.*, 2006] Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., and Fievet, F. (2006). Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, 6(4):866–870.
- [Chen *et al.*, 2008] Chen, H., Roco, M., Li, X., and Lin, Y. (2008). Trends in nanotechnology patents. *Nature nanotechnology*, 3:123–125.
- [Chen *et al.*, 2006a] Chen, J. P., Patil, S., Seal, S., and McGinnis, J. F. (2006a). Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nature Nanotechnology*, 1(2):142–150.
- [Chen *et al.*, 2006b] Chen, Z., Menga, H., Xing, G., Chena, C., Zhaoa, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhaoa, F., Chai, Z., Zhuc, C., Fang, X., Mac, B., and Wan, L. (2006b). Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology letters*, 163:109–120.
- [Colvin, 2003] Colvin, V. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21:1166–1170.
- [Couvreur and Puisieux, 1993] Couvreur, P. and Puisieux, F. (1993). Nanoparticles and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 10(2-3):141–162.

- [Daoud *et al.*, 2005] Daoud, W. A., Xin, J. H., and Zhang, Y. H. (2005). Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities. *Surface Science*, 599(1-3):69–75.
- [Das *et al.*, 2006] Das, M., Patil, S., Bhargavaa, N., Kanga, J.-F., Riedela, L. M., Seal, S., and Hickmana, J. J. (2006). Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.036.
- [Dreher, 2004] Dreher, K. L. (2004). Toxicological highlight, health and environmental impact of nanotechnology: Toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicological sciences*, 77:3–5.
- [Elahifard *et al.*, 2007] Elahifard, M. R., Rahimnejad, S., Haghighi, S., and Gholami, M. R. (2007). Apatite-coated Ag/AgBr/TiO₂ visible-light photocatalyst for destruction of bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, 129(31):9552–+.
- [Elliott and Zhang, 2001] Elliott, D. W. and Zhang, W. X. (2001). Field assessment of nanoscale biometallic particles for groundwater treatment. *Environmental Science & Technology*, 35(24):4922–4926.
- [Fang *et al.*, 2007] Fang, J. S., Lyon, D. Y., Wiesner, M. R., Dong, J. P., and Alvarez, P. J. J. (2007). Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environmental Science & Technology*, 41(7):2636–2642.
- [Franklin *et al.*, 2007] Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., and Casey, P. S. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41(24):8484–8490.
- [Furukawa and O'Reilly, 2007] Furukawa, Y. and O'Reilly, S. (2007). Rapid precipitation of amorphous silica in experimental systems with nontronite (nAu-1) and *Shewanella oneidensis* mr-1. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(2):363–377.
- [Gao *et al.*, 2004] Gao, X. H., Cui, Y. Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K., and Nie, S. M. (2004). In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*, 22(8):969–976.
- [Hochella, 2002] Hochella, M. J. (2002). Nanoscience and technology: the next revolution in the earth sciences. *Earth and Planetary Science Letters*, 203:593–605.
- [Huang *et al.*, 2003] Huang, Z., Chen, H. C., Yip, A., Ng, G., Guo, F., Chen, Z. K., and Roco, M. C. (2003). Longitudinal patent analysis for nanoscale science and

- engineering: Country, institution and technology field. *Journal of Nanoparticle Research*, 5(3-4):333–363.
- [Huang *et al.*, 2008] Huang, Z. B., Zheng, X., Yan, D. H., Yin, G. F., Liao, X. M., Kang, Y. Q., Yao, Y. D., Huang, D., and Hao, B. Q. (2008). Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*, 24(8):4140–4144.
- [Joo *et al.*, 2005] Joo, J., Kwon, S., Yu, T., Cho, M., Lee, J., Yoon, J., and Hyeon, T. (2005). Large-scale synthesis of TiO₂ nanorods via nonhydrolytic sol-gel ester elimination reaction and their application to photocatalytic inactivation of E. coli. *Journal of Physical Chemistry B*, 109:15297–15302.
- [Kamat, 2002] Kamat, P. V. (2002). Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 106(32):7729–7744.
- [Kandlikar *et al.*, 2007] Kandlikar, M., Ramachandran, G., Maynard, A., Murdock, B., and Toscano, W. A. (2007). Health risk assessment for nanoparticles: A case for using expert judgment. *Journal of Nanoparticle Research*, 9(1):137–156.
- [Kiwi and Nadtochenko, 2005] Kiwi, J. and Nadtochenko, V. (2005). Evidence of the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO₂ interface by atr-ftir and laser kinetic spectroscopy. *Langmuir*, 21:4631–4641.
- [Kuzma, 2007] Kuzma, J. (2007). Moving forward responsibly: Oversight for the nanotechnology-biology interface. *Journal of Nanoparticle Research*, 9(1):165–182.
- [Limbach *et al.*, 2005] Limbach, L. K., Li, Y., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M., Gunther, D., and Stark, W. J. (2005). Oxide nanoparticles uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Sciences & Technologies*, 39(23):9370-9376.
- [Lok *et al.*, 2007] Lok, C., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Kwong-Hang Tam, P., Chiu, J., and Che, C.-M. (2006-2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4):527-534.
- [Lu *et al.*, 2000] Lu, L., Sui, M. L., and Lu, K. (2000). Superplastic extensibility of nanocrystalline copper at room temperature. *Science*, 287(5457):1463–1466.
- [Maynard, 2006] Maynard, A. D. (2006). Nanotechnology: assessing the risks. *Nano Today*, 1(2):22–33.
- [Moghimi *et al.*, 2005] Moghimi, S. M., Hunter, A. C., and Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB Journal*, 19(3):311–330.

- [Moore, 2006] Moore, M. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32(8):967–976.
- [Moreau *et al.*, 2007] Moreau, J. W., Weber, P. K., Martin, M. C., Gilbert, B., Hutcheon, I. D., and Banfield, J. F. (2007). Extracellular proteins limit the dispersal of biogenic nanoparticles. *Science*, 316(5831):1600–1603.
- [Mueller and Nowack, 2008] Mueller, N. and Nowack, B. (2008). Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology*, 42 (12):4447–4453.
- [Neal, 2008] Neal, A. L. (2008). What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology*, 17(5):362–371.
- [Nel *et al.*, 2006] Nel, A., Xia, T., and Mädler, L. and Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311:622–627.
- [Norman *et al.*, 2008] Norman, R. S., Stone, J. W., Gole, A., Murphy, C. J., and Sabo-Attwood, T. L. (2008). Targeted photothermal lysis of the pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, with gold nanorods. *Nano Letters*, 8(1):302–306.
- [Oberdörster *et al.*, 2005] Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., and Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2:8:1–35.
- [Padovani *et al.*, 2003] Padovani, S., Sada, C., Mazzoldi, P., Brunetti, B., Borgia, I., Sgamellotti, A., Giulivi, A., D'Acapito, F., and Battaglin, G. (2003). Copper in glazes of renaissance luster pottery: Nanoparticles, ions, and local environment. *Journal of Applied Physics*, 93(12):10058–10063.
- [Park *et al.*, 2008] Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J. P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z., Giannouli, M., Kouridis, H., and Martin, P. (2008). Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive: a case study. *Inhalation Toxicology*, 20(6):547–566.
- [Patil *et al.*, 2007] Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., and Seal, S. (2007). Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*, 28(31):4600–4607.

- [Pollmann *et al.*, 2006] Pollmann, K., Raff, J., Merroun, M., Fahmy, K., and Selenska-Pobell, S. (2006). Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnology Advances*, 24:56–68.
- [Pradell *et al.*, 2008] Pradell, T., Molera, J., Smith, A. D., and Tite, M. S. (2008). The invention of lustre: Iraq 9th and 10th centuries ad.. *Journal of Archaeological Science*, 35(5):1201–1215.
- [Qi *et al.*, 2003] Qi, H. J., Teo, K. B. K., Lau, K. K. S., Boyce, M. C., Milne, W. I., Robertson, J., and Gleason, K. K. (2003). Determination of mechanical properties of carbon nanotubes and vertically aligned carbon nanotube forests using nanoindentation. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 51(11-12):2213–2237.
- [Qi *et al.*, 2006] Qi, K., Daoud, W., Xin, J., C.L., M., Tanga, W., and Cheunga, W. (2006). Self-cleaning cotton. *Journal of Materials Chemistry*, 16:4567–4574.
- [Reddy *et al.*, 2007] Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C., and Punnoose, A. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*, 90(21):213902.
- [Reijnders, 2006] Reijnders, L. (2006). Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. *Journal of Cleaner Production*, 14(2):124–133.
- [Schubert *et al.*, 2006] Schubert, D., Dargusch, R., Raitano, J., and Chan, S. W. (2006). Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(1):86–91.
- [Sondi and Salopek-Sondi, 2004] Sondi, I. and Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on e. coli as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275:177–182.
- [Stoimenov *et al.*, 2002] Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., and Klabunde, K. J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18:6679–6686.
- [Sunada *et al.*, 2003] Sunada, K., Watanabe, T., and Hashimoto, K. (2003). Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 156:227–233.
- [Tratnyek and Johnson, 2006] Tratnyek, P. G. and Johnson, R. L. (2006). Nanotechnologies for environmental cleanup. *Nano Today*, 1(2):44–48.

- [Verran *et al.*, 2007] Verran, J. and Sandoval, G., Allen, N., Edge, M., and Stratton, J. (2007). Variables affecting the antibacterial properties of nano and pigmentary titania particles in suspension. *Dyes and Pigments*, 73:298–304.
- [Vigneshwaran *et al.*, 2006] Vigneshwaran, N., Kumar, S., Kathe, A. A., Varadarajan, P. V., and Prasad, V. (2006). Functional finishing of cotton fabrics using zinc oxide–soluble starch nanocomposites. *Nanotechnology*, 17:5087–5095.
- [Xu *et al.*, 2004] Xu, X. N., Brownlow, W. J., Kyriacou, S. V., Wan, Q., and Viola, J. J. (2004). Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticles optics and living cell imaging. *Biochemistry*, 43:10400–10413.
- [Zhan *et al.*, 2003a] Zhan, G. D., Kuntz, J. D., Garay, J. E., and Mukherjee, A. K. (2003a). Electrical properties of nanoceramics reinforced with ropes of single-walled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters*, 83(6):1228–1230.
- [Zhan *et al.*, 2003b] Zhan, G. D., Kuntz, J. D., Wan, J. L., and Mukherjee, A. K. (2003b). Single-wall carbon nanotubes as attractive toughening agents in alumina-based nanocomposites. *Nature Materials*, 2(1):38–42.
- [Zhang *et al.*, 2007] Zhang, L. L., Jiang, Y. H., Ding, Y. L., Povey, M., and York, D. (2007). Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*, 9(3):479–489.

II. Présentation des modèles

Table des matières du chapitre II : Présentation des modèles de l'étude

II.1	Présentation des modèles biologiques	71
II.1.1	Synechocystis	71
II.1.1.1	Cyanobactéries	71
II.1.1.2	Synechocystis PCC6803	73
II.1.2	Escherichia coli	77
II.2	Présentation des nanoparticules de CeO₂	79
II.2.1	Applications industrielles de nanoparticules (NPs) de CeO ₂	79
II.2.2	Caractéristiques morphologiques des NPs de CeO ₂ utilisées lors de cette étude	83
II.2.2.1	Obtention des suspensions de NPs	83
II.2.2.2	Morphologie des NPs	85
II.3	Matériels et méthodes	89
II.3.1	Milieus tests	89
II.3.2	Cultures cellulaires	89
II.3.3	Préparation des cultures pour les tests avec NPs	91
II.3.4	Préparation des nanoparticules et ions	91
II.4	Références bibliographiques	95

II.1 Présentation des modèles biologiques

Dans la partie suivante, nous allons présenter les modèles biologiques de cette étude à savoir : *Synechocystis*, cyanobactérie appartenant au phytoplancton et à l'origine d'une importante partie de la biomasse pour les chaînes alimentaires aquatiques et l'homme ; et *Escherichia coli*, entérobactérie colonisatrice de l'intestin des mammifères.

II.1.1 *Synechocystis*

Le premier modèle bactérien que nous avons utilisé lors de cette étude est *Synechocystis* PCC 6803. Cette bactérie appartient à la famille des cyanobactéries, organismes qui jouent un rôle très important pour le maintien de la biosphère. En effet, riches en protéines et polysaccharides elles participent à la production de la biomasse pour la chaîne alimentaire, et, en tant qu'organisme photosynthétique, au renouvellement de l'oxygène de l'atmosphère et à limitation de l'effet de serre (Partensky *et al.*, 1999 et Zehr *et al.*, 2001).

II.1.1.1 Cyanobactéries

- **Description générale**

Comme les plantes et les algues, les cyanobactéries effectuent la photosynthèse oxygénique. Pour cela, elles utilisent des pigments collecteurs de lumière tels que la chlorophylle (pigment vert) et la phycocyanine (pigment bleu typique des cyanobactéries). Ceux-ci captent et convertissent l'énergie solaire en énergie « biologique » (ATP) qui permet l'assimilation du carbone atmosphérique en matières biologiques (sucres).

L'abondance de la cyanophycine, relativement à la chlorophylle, est responsable de la coloration bleue-verte des cyanobactéries. C'est ce qui leur a valu pendant longtemps leur nom d'algues « bleues » ou cyanophycées (en grec *kuanos* signifie « bleu »). Elles ont par la suite été rebaptisées cyanobactéries lorsqu'il est apparu qu'elles ne possédaient pas de membrane nucléaire entourant leur génome, au contraire de tous les eucaryotes (algues, plantes, animaux). Plus précisément, les cyanobactéries sont des procaryotes de type « Gram négatif », c'est-à-dire que leur paroi bactérienne n'est pas capable de fixer la coloration dite de « Gram » au contraire d'autres bactéries dites « Gram positif ».

Il existe une grande diversité d'espèces de cyanobactéries qui représentent un groupe génétiquement et morphologiquement très hétérogène.

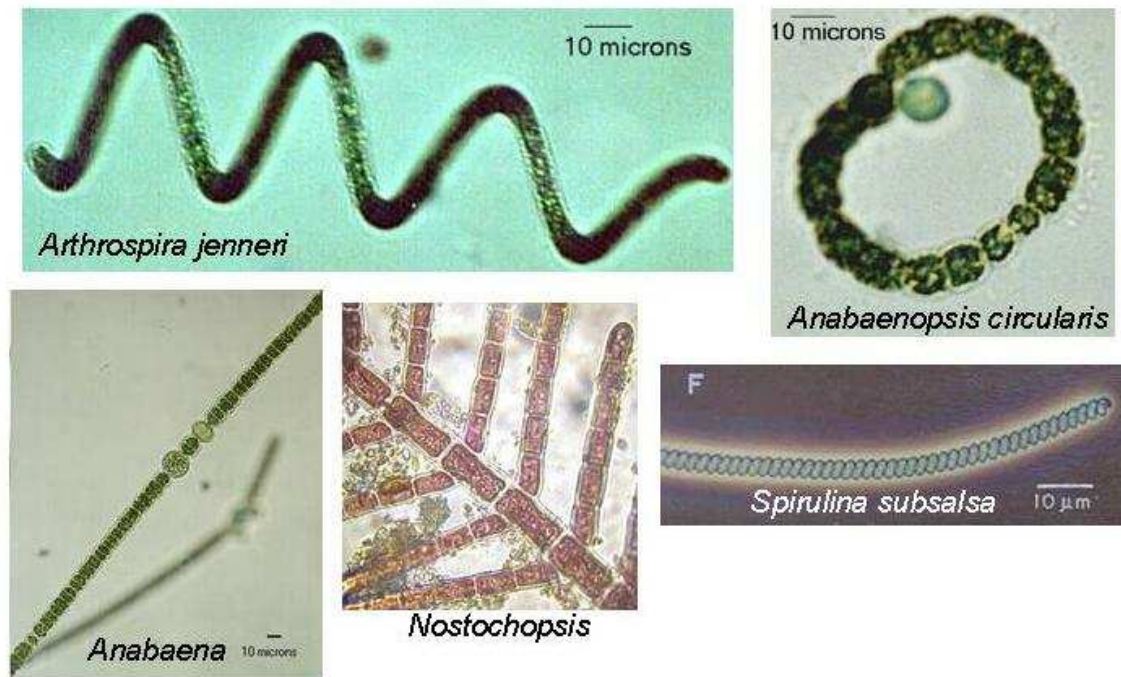


Photo 1 – Quelques exemples de la diversité morphologique présente chez les cyanobactéries. [Crédit : <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>]



Photo 2 – Quelques exemples de la présence de cyanobactéries dans l'environnement. [Crédit : <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>]

Les cyanobactéries peuvent se présenter sous forme unicellulaire ou filamenteuse (les cellules filles restent accrochées aux cellules mères). Elles sont planctoniques ou agrégées en biofilm (Photo 1). Les divers pigments (chlorophylles vertes, carotènes orange, xanthophylles jaunes, phycocyanine bleue et phycoérythrine rouge) qui les composent peuvent leur donner des couleurs très variées (jaune, noir, vert, bleu, brun...).

- **Habitat**

Très présentes dans les océans et les lacs, où elles jouent un rôle important notamment dans le cycle de l'azote, les cyanobactéries sont présentes dans de nombreux environnements (Photo 2). Elles se retrouvent aussi bien dans les milieux aqueux (mer, lac), que dans les sols ou des environnements extrêmes : glaces polaires, sources chaudes et sables du désert (Garcia-Pichel and Pringault, 2001). Leur croissance est favorisée par une eau alcaline riche en minéraux et autres éléments nutritifs. Les cyanobactéries se développent également bien dans divers milieux pollués par l'activité humaine (surabondance de phosphates et nitrates ou métaux lourds) et ont de ce fait un vrai potentiel pour la bioremédiation (pour exemple voir Doshi *et al.*, 2007).

- **Génome**

Leur information génétique est portée en majeure partie par une grande molécule circulaire d'ADN (acide désoxyribonucléique) qui code la plupart des fonctions biologiques des cyanobactéries. En plus de ce chromosome, la plupart des cyanobactéries possèdent un ou plusieurs plasmides qui sont de « petites » molécules d'ADN capables de se répliquer de façon indépendante du chromosome. Ce(s) plasmide(s) code(nt) pour diverses fonctions qui peuvent avantager la propagation des cyanobactéries dans certaines conditions environnementales.

Nous utiliserons ces caractéristiques génétiques lors de la construction de mutants.

II.1.1.2 *Synechocystis* PCC6803

Nous allons nous consacrer à présent plus particulièrement aux particularités de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803 qui a été utilisée lors de cette étude. Elle a été choisie car son génome est, depuis plusieurs années, parfaitement séquencé et manipulable. Elle est de ce fait couramment utilisée pour étudier les résistances aux toxiques.

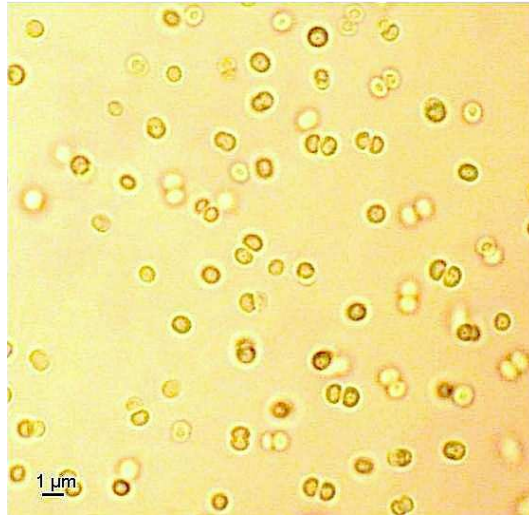


Photo 3 - Photographie en microscopie optique d'une culture de *Synechocystis* PCC 6803 en phase exponentielle. Présence de cellules en division (doublets) et de cellules individuelles (singulets).

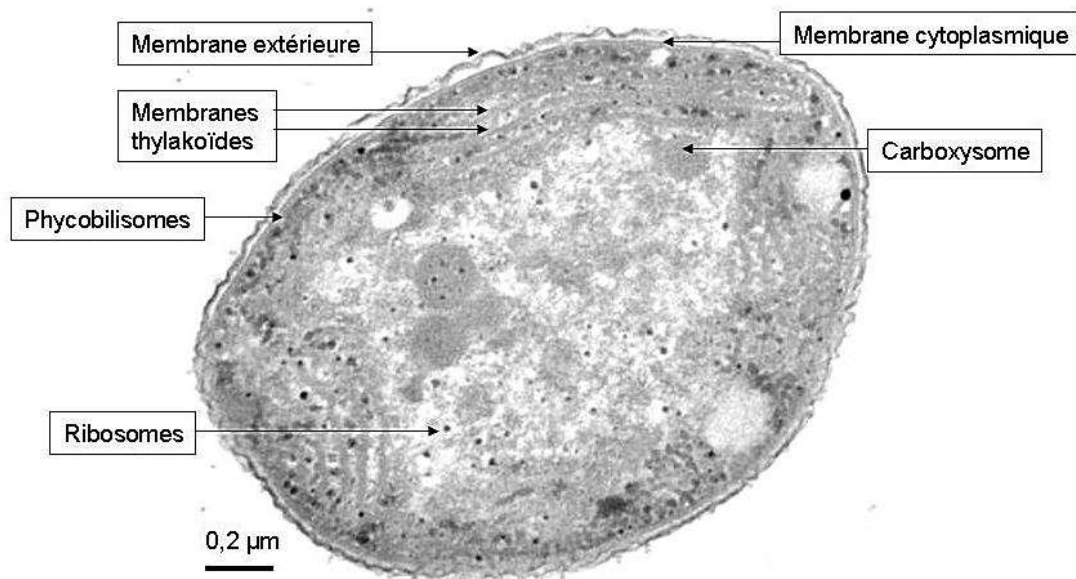


Photo 4 - Photographie MET, d'une coupe de bactérie *Synechocystis* PCC 6803 obtenue au laboratoire et interprétée d'après les travaux de Van de Meene *et al.*, 2005.

- **Description générale**

Synechocystis PCC6803 (Pasteur Culture Collection 6803) est également déposée dans la collection américaine sous le numéro ATCC27184 (<http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm>). Isolée pour la première fois en 1968 dans un lac d'eau douce, elle est une des cyanobactéries les plus étudiées. Sa capacité à pousser aussi bien de façon autotrophe qu'hétérotrophe (en l'absence de lumière mais en présence de glucose), ainsi qu'à être facilement transformable par de l'ADN exogène (elle adsorbe naturellement l'ADN du milieu extérieur), en fait un modèle privilégié pour les études sur la photosynthèse ou l'adaptabilité face à un stress environnemental (Koksharova and Wolk, 2002).

- **Habitat**

Synechocystis est une cyanobactérie d'eau douce mais elle supporte cependant des salinités deux fois supérieures à celle de l'eau de mer (Richardson *et al.*, 1983). En laboratoire, elle est généralement cultivée dans le milieu BG 11, milieu riche en minéraux, ou dans le milieu MM (ce qui est le cas de cette étude) qui est un milieu BG11 enrichi en carbonate de sodium et tamponné à un pH légèrement alcalin (pH=7,5) (voir Matériels et méthodes).

- **Morphologie**

Synechocystis fait partie des cyanobactéries unicellulaires sphériques de diamètre 1 à 2 μm (Photo 3). La Photo 4 présente les principaux constituants de sa structure cellulaire (résultat obtenu au laboratoire par une observation MET après fixation, coloration et coupes microtomes d'une culture de *Synechocystis* PCC 6803). L'interprétation a été réalisée d'après les travaux de van de Meene *et al.*, 2006.

Comme toutes les bactéries Gram négatives, leur enveloppe cellulaire est composée d'une couche mince de peptidoglycanes adjacente à la membrane cytoplasmique. Elles possèdent également une membrane extérieure composée de lipopolysaccharides et de phospholipides de charge de surface négative. Les cyanobactéries en général, et *Synechocystis* en particulier, contiennent un système complexe et très organisé de membranes internes appelées thylakoïdes (structure en forme de sacs aplatis). Dans les thylakoïdes ont lieu les mécanismes de transfert d'électron pour la respiration et la photosynthèse. Cette dernière s'effectue par l'intermédiaire des phycobilisomes, complexes protéiques contenant les pigments photosynthétiques.

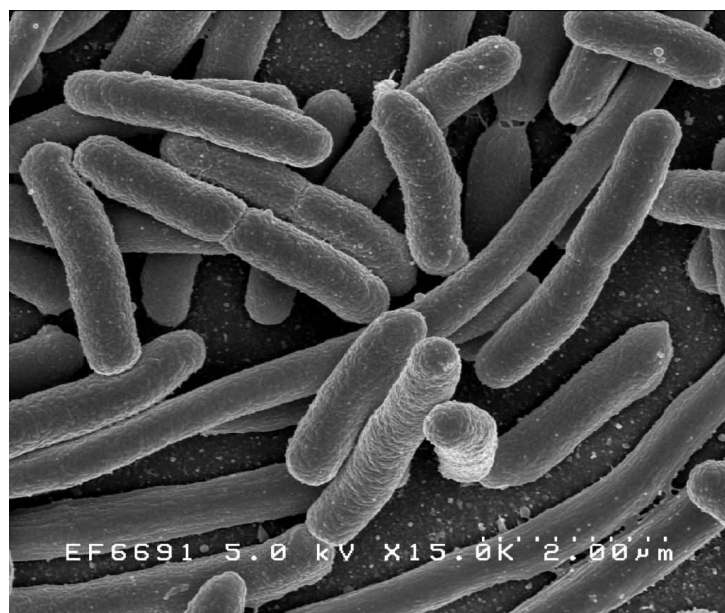


Photo 5 Bactéries *E. coli* observées en MEB. [Crédit : Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH]

II.1.2 *Escherichia coli*

Le deuxième modèle biologique que nous avons utilisé lors de cette étude est l'entérobactérie *Escherichia coli* RR1. Modèle bactérien privilégié des laboratoires, *E. coli* se distingue par sa rapidité de culture (temps de génération de 20-30 min) et par un génome entièrement séquencé et bien connu.

- **Description générale**

Escherichia coli (appelée également *E. coli*) est une bactérie Gram négative de la famille des *Enterobacteriaceae* qui colonise l'intestin des mammifères. Très courante chez l'être humain, elle a été découverte en 1885 dans des selles de nourrissons. Certaines souches peuvent être pathogènes et à l'origine de gastroentérites, infections urinaires, méningites ou septicémies. Les souches non pathogènes constituent la flore bactérienne dominante des intestins de leur hôte. Elles peuvent leur fournir de la vitamine K2 et les protègent d'invasion par des bactéries pathogènes. L'ancienneté de la découverte de cette souche ainsi que sa facilité de culture en font le modèle bactérien le mieux connu actuellement.

- **Habitat**

Leur habitat normal est l'intestin des mammifères, mais elles peuvent également survivre dans un environnement extérieur. La présence d'*E. coli* donne alors des renseignements sur la contamination fécale d'un endroit.

E. coli peut vivre aussi bien de manière anaérobie qu'aérobie et double sa population en 20 min. Cette caractéristique permet d'obtenir des cultures en phase stationnaire en moins de deux heures après repiquage. Afin de se rapprocher au mieux des conditions naturelles de croissance (intestins), *E. coli* est cultivée au laboratoire à 37°C à l'obscurité et agitée. Le milieu de culture utilisé est riche en nutriments. Dans cette étude nous avons utilisé un milieu classique : Luria Bertani (LB) (voir matériels et méthodes et Sambrook 1989).

- **Morphologie**

Escherichia Coli est une bactérie en forme de bâtonnet (bacille) de longueur moyenne 1 à 2 µm et de diamètre d'environ 0,4 µm (Photo 5). Nous avons utilisé la souche sauvage RR1 (voir matériels et méthodes). Elles sont, comme les cyanobactéries, gram négatives.

II.2 Présentation des nanoparticules de CeO_2

II.2.1 Applications industrielles de nanoparticules (NPs) de CeO_2

Les nanoparticules utilisées dans cette étude sont des nanoparticules d'oxyde de cérium CeO_2 .

- **Généralités sur le cérium**

Le cérium fait partie de la famille des lanthanides également appelés terres rares (nom peu approprié car certains éléments ne le sont pas). Le cérium est l'élément le plus abondant de ce groupe.

Découvert en 1803, le cérium est un métal gris argent dont le nom fait référence à l'astéroïde Cérès découvert deux années auparavant. Il est facilement malléable, s'oxyde rapidement à l'air et réagit facilement au contact de l'eau et des acides.

Il possède deux niveaux d'oxydation : Ce^{III} et Ce^{IV} .

Ces deux oxydes possèdent des réactivités très différentes :

- Ce^{III} : réducteur fort en milieux basiques
- Ce^{IV} : oxydant fort en milieux acides

Carte d'identité du cérium :

- Numéro atomique : 58
- Configuration électronique : $[\text{Xe}] 4f^2 6s^2$
- Masse atomique : 140,116 u.
- Présence : dans certains minerais tels que la monazite $\text{Ce}(\text{PO}_4)$

- **Utilisations industrielles de l'oxyde de cérium**

La première utilisation de l'oxyde de cérium a servi à la fabrication de manchons incandescents servant à l'éclairage pour le gaz de ville. Il est encore utilisé dans la fabrication de l'éclairage au gaz pour le camping.

Les oxydes de cérium sont très présents dans l'industrie du verre et des céramiques. Ils sont notamment utilisés sous forme de suspensions aqueuses pour polir les verres d'optique (ils

remplacent actuellement les suspensions d'oxydes de fer). De plus ils servent d'agents de décoloration des verres. En effet, l'oxyde de cérium sert à oxyder les ions Fe^{2+} (très colorés) en ions Fe^{3+} (pouvoir colorant plus faible). Grâce à leurs propriétés d'absorption des UV, les oxydes de cérium sont également utilisés dans les verres de lunette. Dans les émaux et céramiques, les oxydes de cérium sont utilisés comme opacifiants au même titre que les oxydes de titane.

Couramment utilisés en catalyse, les oxydes de cérium se retrouvent parfois dans le revêtement des parois des fours autonettoyants. Ils sont plus largement utilisés dans les pots catalytiques des voitures où ils jouent le rôle de régulateurs de la teneur en oxygène grâce à leurs caractéristiques redox. Ils permettent ainsi d'augmenter le rendement des pots catalytiques qui assurent la conversion du CO en CO_2 et des hydrocarbures imbrûlés en CO_2 et H_2O . Ils permettent de diminuer les fumées noires des gaz d'échappement. Ils sont également utilisés comme additifs au diesel.

- **Utilisations industrielles des nanoparticules d'oxyde de cérium**

Les utilisations industrielles des nanoparticules d'oxyde de cérium (CeO_2) sont proches des utilisations des oxydes de cérium.

Oxinica commercialise notamment un additif constitué de nanoparticules de CeO_2 stabilisées. L'utilisation de cet additif ne nécessite pas de modifier le moteur. Son ajout (5 ppm) à du diesel permet de réduire les émissions de fumée et économiser le diesel grâce aux qualités de catalyseur d'oxydation et de combustion des nanoparticules d'oxyde de cérium. Cette entreprise dit avoir pratiqué des tests environnementaux et toxicologiques prouvant l'innocuité de leurs produits.

Rhodia est également producteur de produits à base de nanoparticules de CeO_2 utilisées dans un additif pour diesel ainsi que dans un revêtement anti-UV pour le traitement du bois.

Les nanoparticules d'aluminium modifiées par des terres rares (dont le cérium) permettent d'améliorer la stabilisation thermique des fuels (Ozawa, 2006). Les nanoparticules d'oxyde de cérium ont également des applications potentielles dans la formation d'alliages à base d'aluminium ou chrome pour des applications à haute température (Patil *et al.*, 2002), dans les cellules photovoltaïques des panneaux solaires (Corma *et al.*, 2004), ou encore comme traitement antireflet pour les optiques (Krogman *et al.*, 2005).

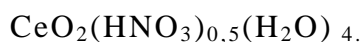
Les nanoparticules d'oxyde de cérium offrent donc un large spectre d'applications (additifs de fuel, catalyseurs, traitement anti-UV et antireflet) d'utilisation courante. Ces applications vont probablement se diversifier encore dans les prochaines années grâce aux récents travaux portant sur leurs caractéristiques particulières, notamment leurs qualités de protection et de régénérescence des cellules neuronales (Tarnuzzer *et al.*, 2005 et Das *et al.*, 2006). Leur présence dans l'environnement n'est pas rare et va être amenée à s'amplifier, il est donc important d'être parfaitement conscient de leurs interactions avec l'environnement et de leur toxicité potentielle.

II.2.2 Caractéristiques morphologiques des NPs de CeO₂ utilisées lors de cette étude

II.2.2.1 Obtention des suspensions de NPs

Les nanoparticules d'oxyde de cérium utilisées dans cette étude ont été synthétisées par Rhodia. Elles ont été obtenues par précipitation des sels de nitrate de cérium $\text{Ce}^{4+}(\text{NO}_3^-)_4$ dans une solution de pH très faible (Chane – Chine, brevet européen 1987).

Le précipité a la formule globale suivante :



Les nanoparticules utilisées dans cette étude sont préparées par remise en suspension du précipité (fourni sous forme de poudre jaune) dans de l'eau ultrapure. Si la concentration en nanoparticules est assez élevée, le pH de la suspension est suffisamment acide (entre 0,5 et 2,5) pour permettre une dispersion spontanée en une suspension stable transparente de couleur jaune pâle. La poudre dispersée, à une concentration de CeO₂ égale à 20 g/L, donne systématiquement une dispersion à un pH de 2.

Il est possible d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de cérium par d'autres procédés : mécanismes mécano-chimiques (Li *et al.*, 2005), chauffage par microondes et sonochimie (Wang *et al.*, 2002), synthèse hydrothermique (Mai *et al.*, 2005), etc. Les formes et tailles des nanoparticules obtenues diffèrent suivant le mode de synthèse utilisé. Pour un exemple de nanotiges d'oxyde de cérium obtenues au laboratoire par la méthode hydrothermique (Mai *et al.*, 2005) voir en annexe (p.309).

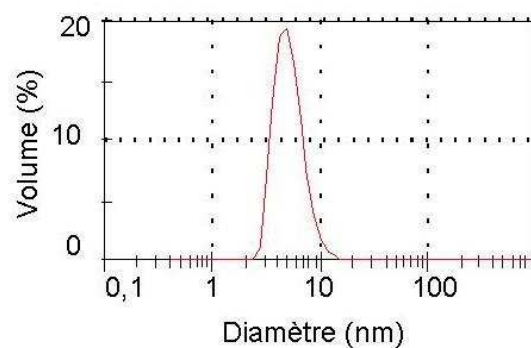


Figure 8 Distribution en volume du diamètre hydrodynamique de nanoparticules de CeO₂ d'une suspension à 10 g/L. Analyse multimodale.

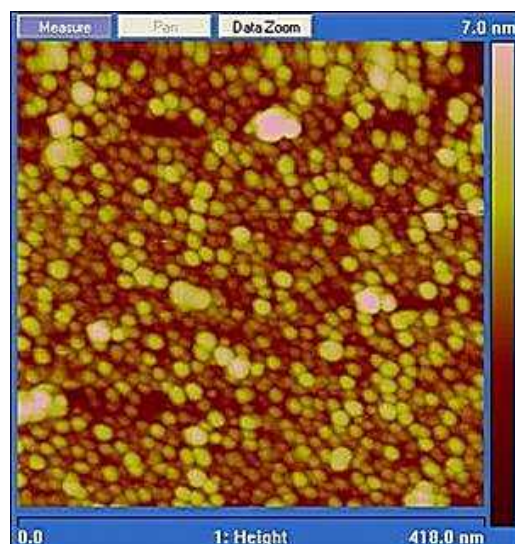


Photo 6 Image AFM de NPs de CeO₂ déposées sur lame de mica. Les images ont été obtenues en mode tapping.

II.2.2.2 Morphologie des NPs

La mesure en diffusion de lumière (Figure 8) et l'observation en microscopie à force atomique (AFM) de nanoparticules déposées sur lames de mica (Photo 6), montrent une distribution assez homogène de tailles (5 à 7 nm) et de forme. Des mesures de potentiel zêta donnent un point de charge nulle (voir chapitre III) à 10,2 pour la poudre humide (Nabavi *et al.*, 1993).

La morphologie des nanoparticules a été plus précisément caractérisée par diffusion centrale des rayons X. Le diagramme d'une suspension à 20g/L de CeO₂ est reporté dans la Figure 9. La gamme de q (vecteur de diffusion entre le rayon incident et le rayon diffusé) est suffisamment large pour que l'on observe à petits q (c'est-à-dire à petits angles de diffusion) la saturation de l'intensité (et donc l'ensemble de la particule), et la limite de Porod à grand q qui permet alors de mesurer la surface des particules. L'analyse a été effectuée comme suit. A $q=0$, l'intensité diffusée par une suspension de fraction volumique ϕ de nanoparticules de volume moyen (en volume) $\langle V \rangle$ vaut :

$$I(q=0) = \phi \langle V \rangle (\Delta\rho)^2 \quad (1)$$

Où $\Delta\rho$ est le contraste de densité de longueur de diffusion entre la particule et l'eau.

On peut calculer l'intégrale Q :

$$Q = \int_0^\infty Iq^2 dq \quad (2)$$

qui, d'après un théorème général, vaut également:

$$Q = 2\pi^2 \phi (1-\phi) (\Delta\rho)^2 \quad (3)$$

En couplant (1) et (3) on obtient aisément une mesure du volume $\langle V \rangle$ de la particule:

$$\langle V \rangle = 2\pi^2 \frac{I(0)}{Q} \quad (4)$$

Dans le cas des particules étudiées, les données de la figure 2 conduisent à :

$I(0)=1925\text{m}^{-1}$ et $Q=1,06 \cdot 10^{30} \text{ m}^{-4}$, d'où l'on déduit :

$$\langle V \rangle = 36 \text{ nm}^3$$

Ce résultat ne nécessite pas la connaissance de la fraction volumique ni de la densité de longueur de diffusion de CeO₂.

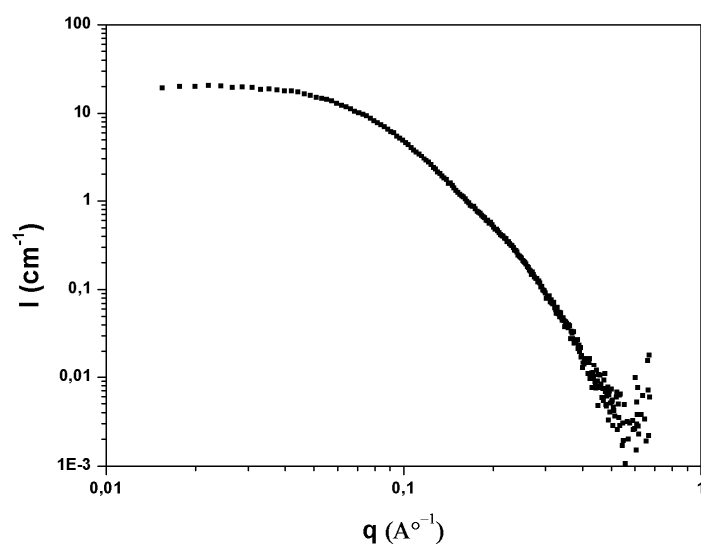


Figure 9 Courbe de diffusion des rayons X (SAXS) obtenue pour une suspension de nanoparticules d'oxyde de cérium à 20 g/L.

On peut cependant pousser l'analyse plus loin. En notant ρ_m la densité de l'oxyde de cérium on a :

$$\phi = \frac{c}{\rho_m} \quad \text{et} \quad \Delta\rho = \rho(\text{CeO}_2) - \rho(\text{H}_2\text{O}) = r_e \left(\frac{\rho_m Z^{e,\lambda}}{M_w} \Big|_{\text{CeO}_2} - \frac{\rho_m Z^{e,\lambda}}{M_w} \Big|_{\text{H}_2\text{O}} \right) \quad (5)$$

où $Z^{e,\lambda}$ est le nombre effectif d'électrons diffusants de CeO_2 (respectivement H_2O) qui peuvent être obtenus à partir de table de la littérature. (NB : ce nombre varie légèrement avec la longueur d'onde λ du rayonnement X utilisé).

En injectant les relations (5) dans l'équation (3) on voit que l'on peut obtenir la densité de l'oxyde de cérium à partir des données expérimentales. On obtient $\rho_m = 7,2 \text{ g/cm}^3$ en accord avec la densité nominale de l'oxyde de CeO_2 ($7,2 \text{ g/cm}^3$). On en déduit que les particules d'oxyde de cérium sont donc bien denses et non poreuses. On peut ainsi calculer leur masse moyenne par mole de particules :

$$M_w = \langle V \rangle \rho_m = 155000 \text{ g/mol}$$

Il existe un second théorème de la diffusion centrale des rayonnements qui permet de calculer la surface spécifique des particules. Il utilise la décroissance observée aux grands angles où l'intensité décroît comme q^{-4} . On a alors :

$$P = \lim_{q \rightarrow \infty} I q^4 = 2\pi\phi \frac{S_{part}}{V_{part}} (\Delta\rho)^2 \quad (6)$$

Expérimentalement, nous obtenons $P = 9 \cdot 10^{38} \text{ m}^{-5}$, ce qui, attendu les valeurs de fraction volumique et de contraste obtenues par les équations (5), conduit à :

$$\frac{S_{part}}{V_{part}} = 2,75 \text{ nm}^{-1} \quad \text{ou encore} \quad \langle S_{part} \rangle = 99 \text{ nm}^2 \quad (7)$$

On peut également relier la surface spécifique des particules à leur masse et obtenir :

$$\sum = 380 \text{ m}^2 / \text{g}$$

Finalement, la forme des particules peut être obtenue par un calage de l'intensité diffusée à tout angle. Ce calage (non détaillé) est obtenu pour **des ellipsoïdes aplatis de grand biaxe 7nm et petit axe 1,75nm**. On retrouve naturellement par calcul le volume obtenu par l'analyse directe.

MILIEU MM(Bg11+ Na₂CO₃+ Hepes)

Solution mère concentrée deux fois:

1) NaNO ₃	3g/l
2) K ₂ HPO ₄	80 mg/l
3) MgSO ₄ 7H ₂ O	150 mg/l
4) CaCl ₂ 2H ₂ O	72 mg/l
5) Acide citrique	12 mg/l
6) Ammonium citrate ferrique	12 mg/l
7) EDTA	2 mg/l
8) Na ₂ CO ₃	400 mg/l
9) Solution A5:	2 ml/l

Milieu prêt à l'emploi:1/2 vol H₂O

1/2 vol solution mère

1,43 g/l final Hepes acide (Modification : 1,43g pour 2 Litres)

Autoclaver 30' à 120°C sous pression 1 bar

pH avant autoclavage: 7,3

pH après : 7,5

Pour un litre de A5, ajouter successivement:

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,390 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0494 g

Calcul de la force ionique du milieu MM**i= 0,053 mol/l**

Soit pour la solution diluée deux fois:

i= 0,027 mol/l**Figure 10 Composition et force ionique du milieu MM.**

II.3 Matériels et méthodes

II.3.1 Milieux tests

L'eau ultrapure à 18,2 MΩ-cm de résistivité est obtenue par un appareil Purelab (Elga). L'eau synthétique modérément dure a été préparée à partir d'eau ultrapure selon les recommandations de l'EPA. Elle a la composition suivante : NaHCO₃ 96 mg/L; CaSO₄, 2H₂O 60 mg/L; MgSO₄ 60 mg/L et KCl 4 mg/L. Le milieu MM, utilisé pour *Synechocystis*, est un milieu minéral BG11 (Rippka *et al.*, 1979) supplémenté avec 0,2 g·L⁻¹ de Na₂CO₃ (Labarre *et al.*, 1989) et tamponné à pH=7 avec 6 mM d'HEPES (acide N-2 hydroxyéthylepipérazine-N-éthane-sulfonique) (Figure 10). Le milieu LB utilisé pour *Escherichia coli* est le milieu classique Luria-Bertani (Sambrook *et al.*, 1989).

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage avant utilisation.

II.3.2 Cultures cellulaires

- ***Synechocystis* PCC 6803**

La souche sauvage de *Synechocystis* PCC6803 provient de la collection de l'institut Pasteur (Paris). En conditions standards, elle est cultivée à 30°C dans le milieu minéral MM. Les cultures sont effectuées en milieu liquide, dans un agitateur orbital (180 rpm) à rampes lumineuses (Infors Multitron II) ou sur milieu solide, obtenu par ajout de 10 g·L⁻¹ de Bacto Agar (Difco). La lumière blanche est obtenue par des tubes néons (Mazda TF 16 W) et l'intensité lumineuse standard de culture est fixée à 2500 lux (≈31,25 μE/m²/s). La concentration cellulaire est déterminée par turbidité à 580 nm (une unité de Densité Optique (DO) correspondant à 5·10⁷ cellules/mL). La vitesse de croissance de la souche de type sauvage (temps de doublement du nombre de cellule) est d'environ 10h à 2500 lux. Les cultures sont maintenues en phase exponentielle (3 repiquages minimum) et utilisées à DO ≈ 0,5 lors des tests en présence de nanoparticules. L'antibiotique utilisé pour sélectionner la présence de plasmides d'expression ou de cassettes de délétion est la Kanamycine (Km) à une concentration de 50 à 300 μg/mL.

- ***Escherichia coli* RR1**

La souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) RR1 *recA*⁺ [F⁻, *hsdS20* (*r*_B⁻, *m*_B⁻), *leuB6*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *xyl-5*, *mtl-1*, *rpsL20*(Sm^R), *glnV44*, λ⁻, {*mcrB-mrr*}], a été utilisée

comme souche sauvage d'*E.coli*. Les cultures sont effectuées en milieu LB liquide, dans un agitateur (200 rpm) maintenu à l'obscurité, dans le milieu de culture LB à 37°C. Les cellules sont remises en culture dans du milieu LB propre, la veille des expériences, à partir de cultures conservées au congélateur à -80 °C. Lors des tests en présence de nanoparticules, elles sont utilisées en phase de ralentissement ($DO_{600nm} \approx 2$).

La souche d'*E. coli* TOP10 [F⁻, *mcrA*, Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ *lacX74* *nupG* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL*(Str^R) *endA1* λ -] (Invitrogen) a été utilisée pour l'amplification de plasmides lors des constructions génétiques et clonages. L'antibiotique utilisé pour sélectionner la présence des plasmides est l'Ampicilline (Amp :100 μ g/mL).

II.3.3 Préparation des cultures pour les tests avec NPs

Les cultures cellulaires ont été systématiquement lavées trois fois dans le milieu de contact de l'expérience (eau ultrapure ou eau synthétique modérément dure ou milieu de culture) avant ajout des nanoparticules ou des toxiques, de la façon suivante :

- une fraction de culture de *Synechocystis* en phase exponentielle (entre 10 et 40 mL suivant les tests) est prélevée, lavée 3 fois (par centrifugation de 10 min à 4500 g, 20°C, puis le culot est resuspendu dans le milieu du test) et la concentration cellulaire ajustée à $2,7 \cdot 10^7$ cellules/mL ($DO_{580nm} \approx 0,5$).
- Une fraction de culture de *E. coli* (entre 10 et 40 mL suivant les tests) en phase stationnaire (mise en culture la veille du test) est prélevée, lavée 3 fois (par centrifugation de 3 min à 4500 g, 20°C, puis resuspension du culot dans le milieu du test) est ajustée à $5 \cdot 10^8$ cellules/mL ($DO_{600nm} \approx 2$).

II.3.4 Préparation des nanoparticules et ions

- **Nanoparticules de CeO₂**

Les nanoparticules de CeO₂ ont été synthétisées par Rhodia. Elles se présentent sous forme d'une poudre jaune, référence : OPAL 18 bis, lot : 90192/99, de composition suivante : CeO₂(HNO₃)_{1/2}, 4H₂O. Les suspensions ont été préparées par ajout de 20 g d'eau ultrapure à 0,32 g de la poudre de nanoparticules afin de former une suspension mère à 10 g/L de CeO₂ (soit 58 mM). La suspension est agitée manuellement quelques minutes ; elle forme naturellement une suspension stable (nanoparticules chargées positivement). La suspension est ensuite laissée à reposer pendant 24h puis filtrée sur filtre stérile 0,22 μ m. Les dilutions

de la suspension mère sont préparées juste avant les tests par dilutions successives (en général de 2 en 2) dans de l'eau ultrapure stérile.

- **Nanoparticules de CeO₂-PAA**

Les nanoparticules de CeO₂ fonctionnalisées (par physisorption) par de l'acide polyacrylique (PAA) ont été obtenues par la méthode de Sehgal *et al.*, 2005. La suspension mère est stable et contient 3,5 g/L de CeO₂. Les nanoparticules sont chargées négativement. Les dilutions de la suspension mère sont préparées juste avant les tests par dilutions successives (en général de 2 en 2) dans de l'eau ultrapure stérile.

- **Solution de Ce³⁺**

Les solutions de Ce³⁺ sont préparées à partir de 0,5 g de Ce(NO₃)₃ · 6H₂O (97%, Rectapur) dans 20 g d'eau ultrapure. La solution obtenue à 58 mM de cérium est filtrée sur filtre stérile 0,22 µm puis diluée juste avant les tests par dilutions successives (en général de 2 en 2) dans de l'eau ultrapure stérile.

II.4 Références bibliographiques

- [Corma *et al.*, 2004] Corma, A., Atienzar, P., Garcia, H., and Chane-Ching, J.-Y. (2004). Hierarchically mesostructured doped CeO₂ with potential for solar-cell use. *Nat Mater*, 3(6):394–397.
- [Das *et al.*, 2006] Das, M., Patil, S., Bhargavaa, N., Kanga, J.-F., Riedela, L. M., Seal, S., and Hickmana, J. J. (2006). Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.036.
- [Doshi *et al.*, 2007] Doshi, H., Ray, A., and Kothari, I. L. (2007). Bioremediation potential of live and dead spirulina: Spectroscopic, kinetics and sem studies. *Biotechnology And Bioengineering*, 96(6):1051–1063.
- [Garcia-Pichel and Pringault, 2001] Garcia-Pichel, F. and Pringault, O. (2001). Microbiologycyanobacteria track water in desert soils. *Nature*, 413(6854):380–381.
- [Koksharova and Wolk, 2002] Koksharova, O. A. and Wolk, C. P. (2002). Genetic tools for cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(2):123–137.
- [Krogman *et al.*, 2005] Krogman, K. C., Druffel, T., and Sunkara, M. K. (2005). Anti-reflective optical coatings incorporating nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(7):S338–S343.
- [Labarre *et al.*, 1989] Labarre, J.; Chauvat, F. & Thuriaux, P. (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic-resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC-6803. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171, 3449-3457.
- [Li *et al.*, 2005] Li, Y. X., Chen, W. F., Zhou, X. Z., Gu, Z. Y., and Chen, C. M. (2005). Synthesis of CeO₂ nanoparticles by mechanochemical processing and the inhibiting action of nacl on particle agglomeration. *Materials Letters*, 59:48–52.
- [Mai *et al.*, 2005] Mai, H. X., Sun, L. D., Zhang, Y. W., Si, R., Feng, W., Zhang, H. P., Liu, H. C., and Yan, C. H. (2005). Shape-selective synthesis and oxygen storage behavior of ceria nanopolyhedra, nanorods, and nanocubes. *journal of physical chemistry b*, 109(51):24380–24385.
- [Nabavi *et al.*, 1993] Nabavi, M., Spalla, O., and Cabanet, B. (1993). Surface chemistry of nanometric ceria particles in aqueous dispersion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 160:459–471.

- [Ozawa, 2006] Ozawa, M. (2006). Thermal stabilization of catalytic compositions for automobile exhaust treatment through rare earth modification of alumina nanoparticle support. *Journal of Alloys and Compounds*, 408:1090–1095.
- [Partensky *et al.*, 1999] Partensky, F., Hess, W. R., and Vaultot, D. (1999). Prochlorococcus, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1):106–+.
- [Patil *et al.*, 2002] Patil, S., Kuiry, S. C., Seal, S., and Vanfleet, R. (2002). Synthesis of nanocrystalline ceria particles for high temperature oxidation resistant coating. *Journal of Nanoparticle Research*, 4(5):433–438.
- [Richardson *et al.*, 1983] Richardson, D. L., Reed, R. H., and Stewart, W. D. P. (1983). *Synechocystis* PCC6803: a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 18(1-2):99–102.
- [Rippka *et al.*, 1979] Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61.
- [Sambrook *et al.*, 1989] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [Tarnuzzer *et al.*, 2005] Tarnuzzer, R., Colon, J., Patil, S., and Seal, S. (2005). Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Letters*, 5:12.
- [van de Meene *et al.*, 2006] van de Meene, A. M., Hohmann-Marriott, M. F., Vermaas, W. F., and Roberson, R. W. (2006). The three-dimensional structure of the cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol*, 184:259–270.
- [Wang *et al.*, 2002] Wang, H., Zhu, J.-J., Zhu, J.-M., Liao, X.-H., Xu, S., Dinga, T., and Chena, H.-Y. (2002). Preparation of nanocrystalline ceria particles by sonochemical and microwave assisted heating methods. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4:3794–3799.
- [Zehr *et al.*, 2001] Zehr, J. P., Waterbury, J. B., Turner, P. J., Montoya, J. P., Omoregie, E., Steward, G. F., Hansen, A., and Karl, D. M. (2001). Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *NATURE*, 412(6847):635–638.

III. Physicochimie des nanoparticules

Table des matières du chapitre III : Physicochimie des nanoparticules

III.1	Stabilité physicochimique des nanoparticules	101
III.1.1	Introduction à la stabilité colloïdale	101
III.1.1.1	Phénomènes d'agrégation : la théorie DLVO	101
III.1.1.2	Phénomènes de dissolution	105
III.1.2	Importance de la stabilité lors des tests de toxicité	107
III.1.2.1	Impact de l'agrégation	107
III.1.2.2	Impact de la dissolution	109
III.1.2.3	Impact d'une stabilisation stérique	111
III.2	Caractérisation de la stabilité des nanoparticules de CeO₂	115
III.2.1	Agrégation	115
III.2.2	Oxydoréduction - Diagramme de Pourbaix	119
III.2.3	Suivi cinétique de la dissolution par ICP-MS	123
III.2.4	Modèle de réduction/dissolution	123
III.3	Matériels et méthodes	131
III.3.1	Diffusion de lumière dynamique (DLS)	131
III.3.2	Spectrométrie de masse quadripolaire à source plasma (ICP-MS)	131
III.3.3	Spectroscopie de photoélectron X (XPS)	133
III.4	Références bibliographiques	137

III.1 Stabilité physicochimique des nanoparticules

III.1.1 Introduction à la stabilité colloïdale

Les colloïdes sont des suspensions de particules de petite taille (allant du micron au nanomètre). Dans notre étude, les systèmes colloïdaux étudiés sont des suspensions de nanoparticules d'oxyde de cérium. Elles sont soumises à deux phénomènes majeurs d'instabilité : l'aggrégation et la dissolution qui, nous l'avons vu, sont susceptibles d'avoir un impact sur les interactions observées avec les cellules. Nous mettrons donc l'accent dans cette section, et la section suivante sur la stabilité des nanoparticules en commençant par un rappel des principaux concepts de la stabilité colloïdale.

III.1.1.1 Phénomènes d'aggrégation : la théorie DLVO

Lorsque l'on considère la stabilité d'un système colloïdal, la théorie la plus couramment évoquée est la théorie DLVO. Ce sigle est l'abréviation de Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek qui élaborèrent cette théorie en 1948. La théorie DLVO repose sur l'approximation du potentiel d'interaction entre deux particules par la somme des contributions répulsives et attractives qui agissent sur ce système. Les interactions agissant sur le système sont majoritairement de deux types :

- forces de Van der Waals,
- forces électrostatiques.

Les forces de Van der Waals sont présentes dans toutes les molécules (polaires et non polaires), et elles proviennent principalement de la fluctuation des charges à l'intérieur d'une particule qui produit un dipôle temporaire dans une molécule induisant lui-même un dipôle temporaire dans la molécule adjacente. Pour cette raison elles sont également appelées : attraction entre dipôles induits. Ce sont des forces attractives à longue distance. Pour de petites particules sphériques de même rayon r , elles sont définies par la relation suivante :

$$U_{VdW}(h) = -\frac{rA}{12(h - 2r)}$$

avec r , rayon de la particule
 A , constante d'Hamaker
 h , distance entre les particules (de centre à centre)

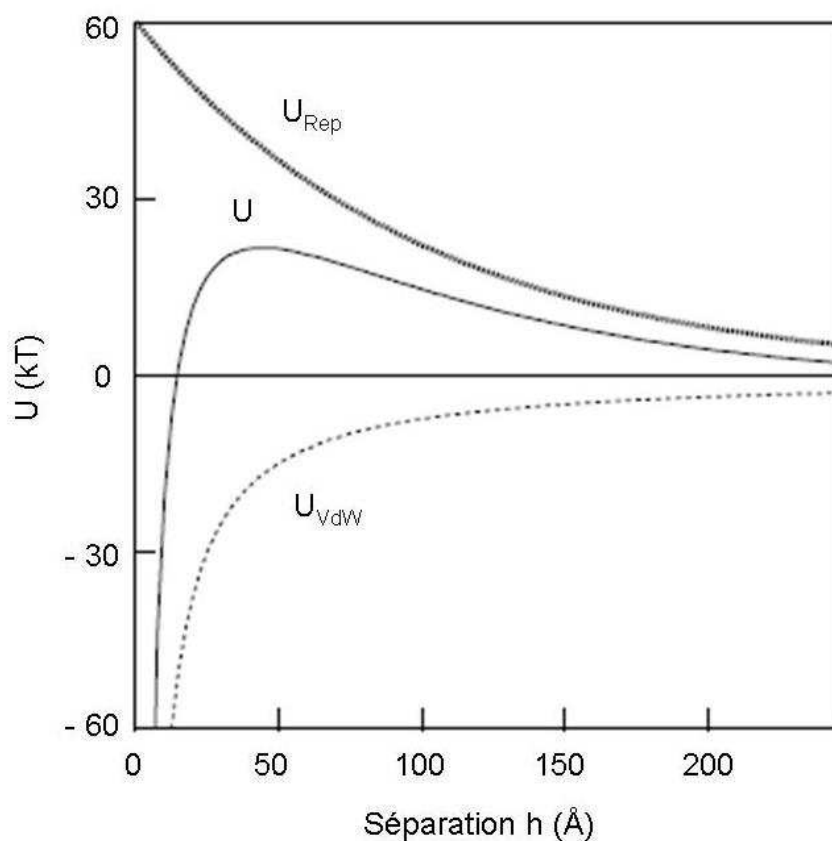


Figure 11 Potentiel d'interaction (U) entre particules sphériques chargées en fonction de la distance de séparation entre particules.
D'après la théorie DLVO, U est la somme de U_{Rep} (forces électrostatiques répulsives) et U_{VdW} (forces de Van der Waals).

Les forces électrostatiques résultent de la présence d'une double couche ionique à la surface de la particule (résultat d'une séparation de charges aux interfaces). Ces forces sont présentes lorsque les particules sont chargées, par exemple lorsqu'elles portent des groupements ioniques ou sont recouvertes d'espèces chargées (ex : tensioactifs) adsorbées à leur surface. La répulsion électrostatique entre deux sphères est définie par :

$$U_{rep}(h) = \frac{Z^2 L_B}{h} \frac{e^{-\kappa(h-2r)}}{(1 + \kappa r)^2}$$

avec κ , inverse de la longueur de Debye (épaisseur de la double couche ionique autour de la particule)

Z , charge effective du colloïde

L_B , longueur de Bjerrum (longueur pour laquelle l'interaction électrostatique entre deux colloïdes est égale à $k_B T$; soit 7,1 Å pour des solutions aqueuses à température ambiante)

Le potentiel d'interaction U (Figure 11) entre deux colloïdes est défini par la somme des interactions électrostatiques et des interactions de Van der Waals :

$$U \approx U_{rep}(h) + U_{vdW}(h)$$

La théorie DLVO montre qu'il y a un puits attractif à courte distance, et un maximum d'énergie à une distance intermédiaire. Un second puits de potentiel peut également apparaître à courte distance en présence d'un fort écrantage (atténuation) électrostatique. Afin d'assurer la dispersion des particules et éviter leur coagulation (chute dans le premier puits de potentiel), le potentiel d'interaction entre nanoparticules doit être plus élevé que l'énergie thermique kT (où k est la constante de Boltzmann et T la température absolue). Des arguments cinétiques (Verwey et Overbeek) permettent de montrer qu'un potentiel $U > 15kT$ est suffisant pour maintenir la stabilité colloïdale. La barrière de potentiel pour des particules nanométriques est de cet ordre de grandeur, elles ne peuvent donc pas, en principe, rester sous forme stable éloignées les unes des autres. En effet, plus un système a une surface spécifique importante (ce qui est le cas des nanoparticules), plus la tension de surface est importante. L'agrégation des nanoparticules permet une réduction de cette tension de surface (diminution

de la surface spécifique lorsque l'on passe de la nanoparticule à l'agrégat) et une diminution de l'enthalpie libre du système. L'aggrégation est donc l'évolution naturelle d'une suspension nanométrique. Le fait d'observer des dispersions de nanoparticules stables dans le temps implique qu'il existe une répulsion obtenue par la présence de gros ions, molécules ou macromolécules adsorbées en surface des nanoparticules. De plus, la longueur de Debye (voir principe du potentiel zêta en annexe) fait intervenir la valence (Z) des ions en surface des nanoparticules. Ceux-ci ont également un rôle important dans la stabilité des suspensions. En effet, en jouant sur le pH et la force ionique du milieu, il est possible (en augmentant les répulsions électrostatiques) de stabiliser parfaitement et durablement une suspension de nanoparticules.

La valeur du pH pour laquelle les nanoparticules ont une charge de surface nulle est appelée point de charge nulle (PCN). Lorsque le pH se rapproche de cette valeur, les nanoparticules s'agregent.

Les nanoparticules sont soumises au phénomène de diffusion (mouvement Brownien). D'après la formule de Stokes-Einstein (1905), la diffusion d'une particule dans un fluide est décrite par l'équation suivante :

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta N_{Av}r}$$

avec R constante des gaz parfaits

η viscosité du fluide

N_{Av} Nombre d'Avogadro

La diffusion est inversement proportionnelle à la taille des particules. Les nanoparticules diffusent donc beaucoup plus rapidement que les microparticules. La probabilité de rencontre et de choc entre deux nanoparticules est donc très élevée, et diminue avec l'augmentation de la taille des agrégats.

III.1.1.2 Phénomènes de dissolution

La dissolution augmente lorsque la tension de surface augmente et le rayon des particules diminue. Les nanoparticules possédant, par définition, un très petit rayon et une importante tension de surface sont donc particulièrement sensibles aux phénomènes de dissolution.

Meulenkamp a notamment montré la dépendance de la dissolution de nanoparticules d'oxyde de zinc en fonction de la taille des particules (Meulenkamp, 1998). La cinétique de dissolution peut être plus ou moins rapide suivant la composition de la nanoparticule, le pH le solvant, et la concentration des ions en solution.

III.1.2 Importance de la stabilité lors des tests de toxicité

Nous avons évoqué précédemment l'importance de maintenir une bonne stabilité colloïdale lors des tests de toxicité avec des nanoparticules. Cette considération est cependant très rarement prise en compte lors des tests décrits dans la littérature.

En effet, les nanoparticules sont en général simplement caractérisées par des observations de leur forme en microscopie électronique, qui ne donnent que des informations partielles sur les nanoparticules et aucune indication sur l'état de dispersion. En effet, les observations en microscopie électronique sont réalisées sur des échantillons séchés. Lors du séchage, le front d'évaporation du solvant induit des forces capillaires qui agrègent les nanoparticules en paquets. Les observations ne permettent pas de différencier les agrégats obtenus à cause du séchage, des agrégats déjà présents initialement en solution.

Seules des mesures en milieu liquide permettent de valider la stabilité de la suspension sous forme nanométrique. Les principales techniques utilisées sont la diffusion de lumière et la diffusion de rayons X. Elles donnent toutes les deux accès à la taille des nanoparticules ainsi qu'à leur forme pour la diffusion des rayons X. Certaines études de toxicité ont utilisé ce type de mesures, mais en se limitant à la mesure de la stabilité des solutions de nanoparticules initiales. Rares sont les études qui mesurent également la dispersion des nanoparticules dans le milieu de culture utilisé lors de la mise en contact. Pourtant cette donnée de stabilité est essentielle pour comprendre les phénomènes en jeu lors des interactions avec des modèles vivants, ainsi que pour valider l'impact réel d'une taille nanométrique.

Comme, nous l'avons vu précédemment, il existe deux formes principales d'instabilité pour une suspension de nanoparticules : l'agrégation et la dissolution.

III.1.2.1 Impact de l'agrégation

L'agrégation est un phénomène particulièrement favorisé dans le cas des systèmes nanométriques par leur grande énergie de surface et le mouvement Brownien. L'agrégation des nanoparticules lors des tests de survie peut apparaître soit dès l'origine (la suspension

fournie ou synthétisée se présente déjà sous forme agrégée), soit instantanément lors de l'introduction des nanoparticules dans le milieu de culture du test. Certaines conclusions d'études récentes tendent à minimiser ce problème en évoquant la forte probabilité d'agrégation des nanoparticules dans l'environnement. Il est alors proposé de vérifier la toxicité lorsque les nanoparticules sont sous une forme coagulée. Néanmoins, les études réalisées sur ce type de nanoparticules agrégées sont, dans la grande majorité des cas, dépourvues d'informations quant à la distribution de tailles des agrégats ainsi qu'à leurs effets cytotoxiques potentiels associés. Ces données sont pourtant cruciales comme le montrent Limbach *et al.*, 2005. Ils étudient les effets toxiques d'agrégats de nanoparticules de différents oxydes et différentes tailles sur des cellules pulmonaires. Ils montrent notamment qu'aucune nanoparticule ne pénètre dans la cellule sous sa forme nanométrique d'origine, mais que toutes s'agrègent en agrégats plus ou moins importants suivant la taille des nanoparticules. Pour les « nanoparticules » de taille plus imposante (200 nm), seules les particules individualisées sédimentent puis sont invaginées par les cellules. Ils montrent que la taille des nanoparticules a indirectement un impact (en fonction de leur capacité à former des agrégats) sur la toxicité, tandis que la concentration initiale en particules et leur surface spécifique totale n'ont qu'une influence mineure.

Si l'étude de l'impact toxique des agrégats a une importance, elle ne renseigne que sur la toxicité de particules de tailles importantes et occulte l'information liée aux caractéristiques réellement nanométriques des nanoparticules. Dans cette étude, nous avons volontairement utilisé un modèle où les nanoparticules ne rentrent en contact avec les bactéries que sous forme nanométrique. Cela nous a permis de nous concentrer sur le véritable effet « nano ».

III.1.2.2 Impact de la dissolution

La seconde cause d'instabilité d'une suspension de colloïdes est la dissolution. En effet, une grande partie des atomes constitutifs des nanoparticules (50 % dans le cas de la suspension de CeO₂ que nous avons étudiée) sont des atomes de surface. Ils sont de ce fait accessibles lors des phénomènes de dissolution.

Connaître le degré de dissolution des nanoparticules étudiées est très important pour plusieurs raisons. Premièrement, si les nanoparticules se dissolvent avec le temps, leur taille diminue, et leurs propriétés nanométriques s'accroissent. Par exemple, il peut y avoir une différence de toxicité (éventuellement liée à une différence de pénétration cellulaire) entre des nanoparticules de 7 nm et des nanoparticules de 3 nm. Deuxièmement, certains ions

constitutifs des nanoparticules peuvent être plus toxiques sous leur forme ionique que les nanoparticules elles-mêmes.

La toxicité de certains ions métalliques envers les bactéries n'est en effet plus à démontrer. Lors de tests in-vitro (Derfus *et al.*, 2004), il a été démontré que le cadmium libéré par des nanoparticules de CdS était plus toxique que les particules elles-mêmes. Franklin *et al.*, 2007 ont également démontré que la toxicité de différentes particules à base de zinc (ZnO, ZnO nanoparticulaires, et ZnCl₂) montraient la même toxicité vis-à-vis d'une microalgue que la quantité équivalente de zinc préalablement dissous. De même, Brunner *et al.*, 2006, ont montré l'influence de la solubilité sur la réponse cytotoxique à différents oxydes et notamment une toxicité accrue de certains composés solubles (ZnO et FeO) comparée à celle de nanoparticules de solubilité plus faible (ex : CeO₂ et TiO₂). La rapidité de dissolution des nanoparticules de ZnO est en effet un problème récurrent lors de l'étude de ce type de particules. Ces nanoparticules sont pourtant très utilisées dans de nombreux produits commercialisés et notamment dans les crèmes solaires.

A contrario, certaines bactéries sont connues pour leur capacité à « capter » les radionucléides et des métaux toxiques. Pollmann *et al.*, 2006, ont notamment démontré l'accumulation d'uranium, plomb, cuivre, aluminium, cadmium et certains métaux nobles dans des bactéries *Bacillus sphaericus*. Ces bactéries sont capables de fabriquer des nanoparticules (intracellulaires) à partir d'ions de métaux nobles (palladium, platine et or).

La dissolution peut également avoir un impact sur la clairance (volume de plasma totalement débarrassé d'une substance donnée par unité de temps) des nanoparticules. Par exemple, dans le cas des cellules pulmonaires, il a été montré que des nanoparticules (TiO₂) sont moins facilement phagocytées que des particules de taille plus importante mais que leur dissolution et donc leur clairance est favorisée (Bermudez *et al.*, 2004).

Les nanoparticules de CeO₂ ne sont pas connues pour être des particules facilement solubilisables ; cependant la présence du milieu bactérien pourrait modifier cette donnée.

III.1.2.3 Impact d'une stabilisation stérique

Afin d'éviter les phénomènes d'agrégation et de solubilisation, il est possible d'avoir recours à la stabilisation stérique des nanoparticules. Pour cela, l'adsorption de molécules telles que les tensioactifs et polymères sont nécessaires. La présence de certains polymères est

notamment nécessaire dans le cas des nanoparticules destinées à des systèmes de libération contrôlée *in vivo*. La présence, par exemple, de PEG (polyéthylène glycol) est connue pour rendre les nanoparticules « furtives » c'est-à-dire invisibles aux macrophages. Il est cependant essentiel d'avoir conscience que ces composés jouent un rôle très important lors du contact cellulaire. Certaines études ont notamment montré d'importantes différences de toxicité selon que les nanoparticules étaient recouvertes ou non de polymères et suivant le type de polymère utilisé (Berry *et al.*, 2004) .

Dans cette étude, nous avons majoritairement utilisé des nanoparticules non stabilisées par des polymères afin de dissocier l'effet de leurs caractéristiques intrinsèques de celui dépendant du type de polymères utilisés. Nous avons cependant comparé les résultats obtenus pour des nanoparticules non recouvertes à ceux obtenus pour des nanoparticules recouvertes d'acide polyacrylique (PAA) afin de vérifier l'influence de la charge de surface (positive dans le cas non recouvert, négative en présence de PAA) sur les interactions observées.

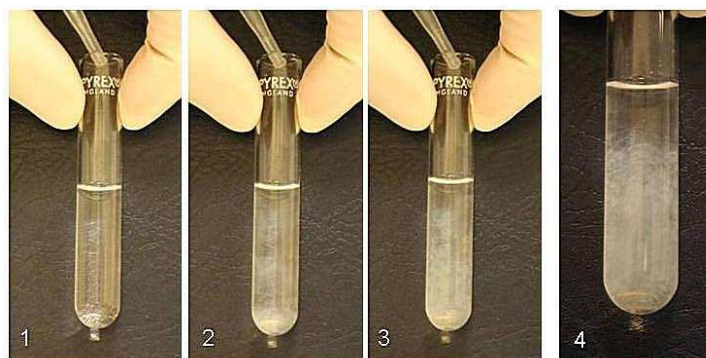


Photo 7 - De 1 à 3 : ajout progressif de nanoparticules de CeO_2 (10 g/L) à une solution de MM (100 %), il y a formation d'un précipité blanc. 4 : agrandissement du précipité blanc obtenu.

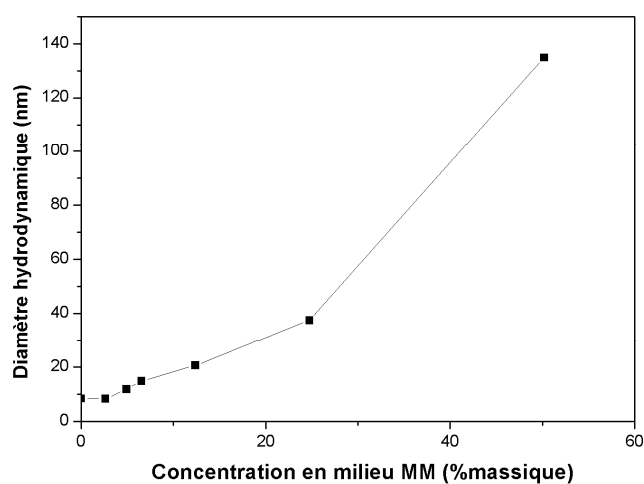


Figure 12 - Mesures DLS de l'évolution du diamètre hydrodynamique de nanoparticules de CeO_2 (5 g/L) en fonction de la concentration en milieu de culture MM.

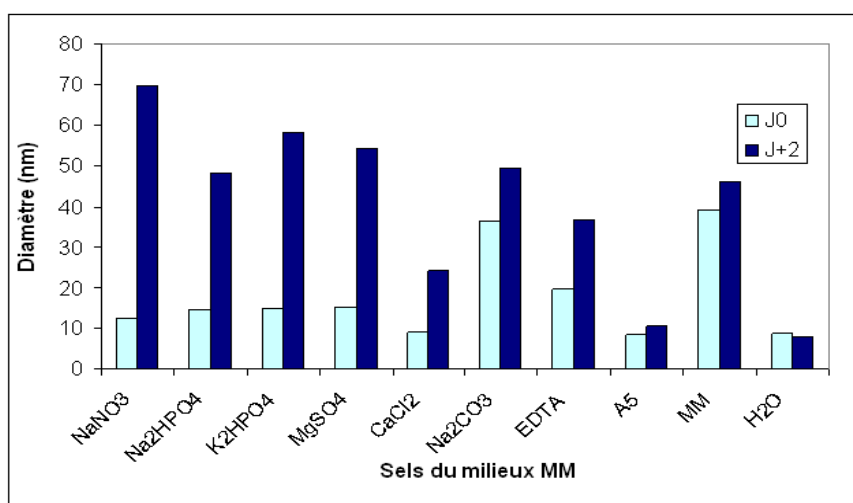


Figure 13 - Histogramme des diamètres hydrodynamiques d'une solution de CeO_2 (5 g/L) en présence des sels constitutifs du milieu MM (à leur concentration dans le MM). Mesures effectuées immédiatement après mélange (J0) et après 2 jours (J+2).

III.2 Caractérisation de la stabilité des nanoparticules de CeO_2

III.2.1 Agrégation

Nous l'avons vu précédemment, il est primordial de connaître l'état de la dispersion des nanoparticules lors de leur contact avec les bactéries, c'est-à-dire dans leur milieu de culture.

Une simple observation visuelle (Photo 7) met en évidence la précipitation très rapide de quelques gouttes d'une suspension de nanoparticules de CeO_2 (10 g/L) dans une solution de MM (formation d'un précipité blanc). L'importante précipitation observée est due à la forte concentration ionique du MM (26,6 mM) et à « l'effet de gouttes » lors de l'introduction des nanoparticules. En effet, même si quelques gouttes de nanoparticules dans un volume de quelques millilitres de MM représentent une suspension assez diluée, au moment de l'ajout les nanoparticules sont concentrées dans la goutte et l'interface entre la goutte de nanoparticules et la solution de MM est alors favorable aux phénomènes d'agrégation.

Nous avons alors cherché s'il existait une dilution adéquate de MM pour permettre la survie de *Synechocystis* dans de bonnes conditions sans provoquer d'agrégation des nanoparticules. Ces expériences ont été réalisées par diffusion de lumière dynamique (DLS). Les résultats obtenus (Figure 12) représentent la mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en fonction de la concentration en MM. Il existe un plateau jusqu'à 2,6 % de MM pour lequel le diamètre des nanoparticules reste inchangé par rapport au diamètre initial. Pour toutes concentrations supérieures à 2,6 %, le diamètre des nanoparticules augmente rapidement en fonction de la concentration : agrégation rapide (en moins d'une minute) des particules. Malheureusement 2,6 % de MM ne permettent pas de fournir aux cellules des conditions optimales pour leur croissance.

L'influence individuelle de chaque sel contenu dans le MM sur l'agrégation des nanoparticules a été quantifiée dans une deuxième étape. Pour cela, la taille des nanoparticules a été mesurée en présence de solutions salines des sels composant le MM (Figure 13). Immédiatement après ajout, Na_2CO_3 est le principal responsable de l'agrégation observée lors de l'ajout du MM.

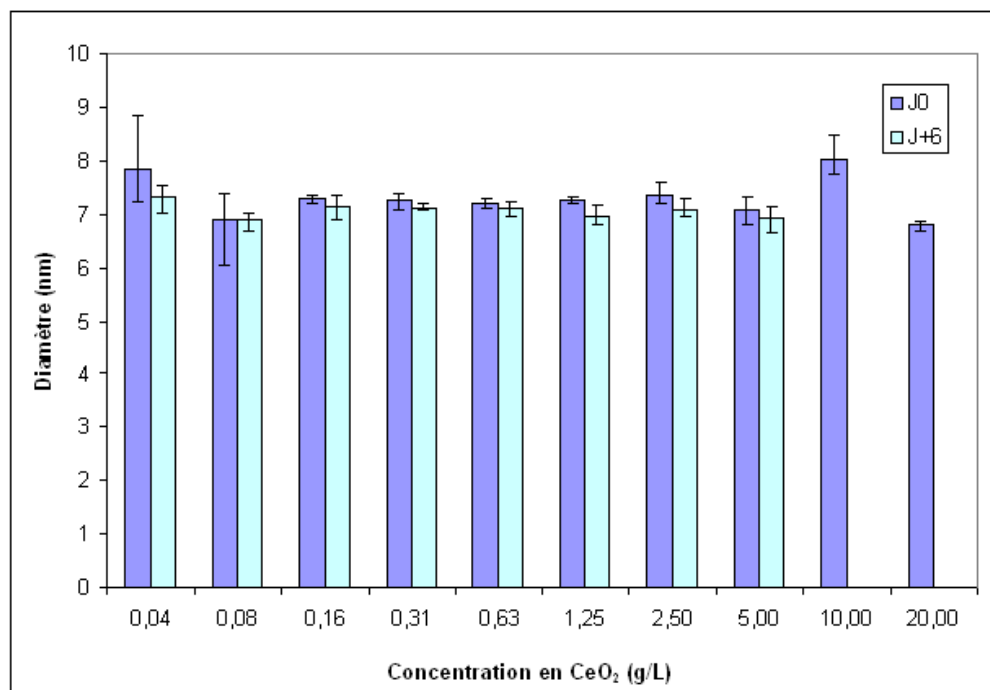


Figure 14 Histogramme représentant l'évolution des diamètres des nanoparticules de CeO₂ de différentes dilutions dans l'eau en une semaine.

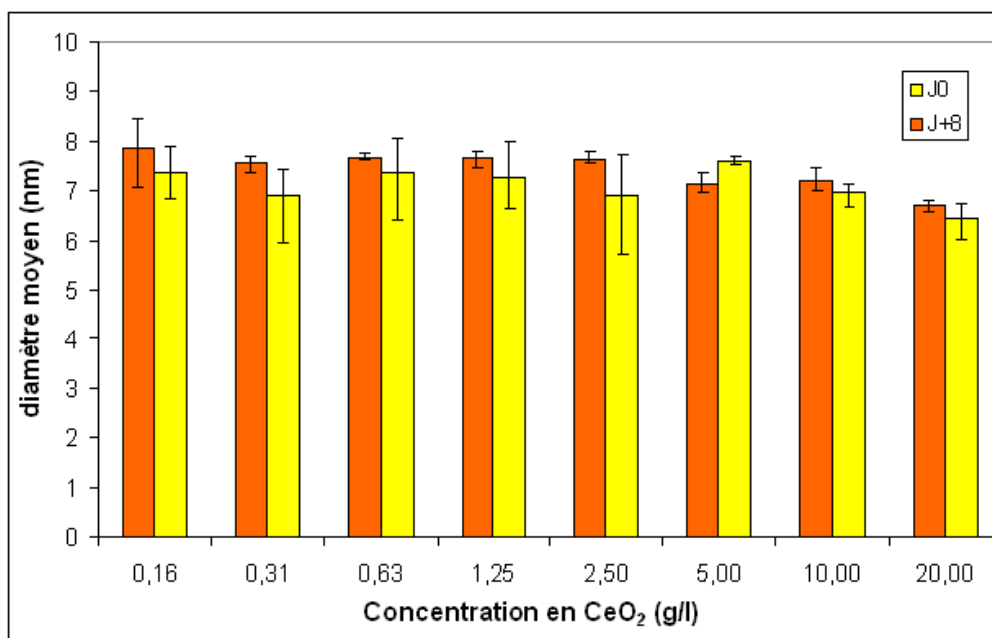


Figure 15 Histogramme représentant l'évolution des diamètres des nanoparticules de CeO₂ de différentes dilutions dans l'acide nitrique (10^{-2} M) en une semaine.

Cependant les autres sels contribuent également à l'agrégation des nanoparticules (après 2 jours), sauf pour CaCl_2 ou la solution A5 (mais présente en très faible concentration dans le MM). L'utilisation du MM lors de la mise en contact NPs-cellules est donc remise en cause.

Les expériences réalisées dans le milieu LB (milieu de culture d'*E. coli*) aboutissent également à l'obtention d'un précipité blanc lors de l'ajout de nanoparticules de CeO_2 . Dans ce cas, en plus du sel, le milieu LB contient également des molécules organiques ainsi que des polyélectrolytes et il est probable que ceux-ci s'adsorbent sur les nanoparticules et modifient leur chimie de surface (Spalla, 2002).

A la suite de ces expériences, les mises en contact nanoparticules-bactéries ont donc été réalisées préférentiellement dans de l'eau ne contenant pas de sels ni de molécules organiques : eau ultrapure et eau modérément dure (dont la composition est donnée dans la partie matériels et méthode du chapitre II), afin d'éviter l'agrégation des nanoparticules, et pendant un temps de contact court (3 h), pour limiter la mortalité bactérienne due au stress osmotique.

La stabilité des nanoparticules dépend de la force ionique du milieu et de son pH. Nous avons comparé la cinétique d'agrégation de suspensions de nanoparticules de CeO_2 diluées dans l'eau (sans ajustement de pH) à celle de suspensions diluées dans de l'acide nitrique (pH=2). Les résultats obtenus au bout d'une semaine (mesures après agitation des solutions) sont présentés Figure 14 et Figure 15. Les nanoparticules conservent un diamètre hydrodynamique compris entre 6,5 et 7,5 nm que ce soit dans l'eau ultrapure ou dans l'acide nitrique : il n'y a aucune formation d'agrégats. Le pH des suspensions, à ces concentrations, ne joue donc pas un rôle primordial sur l'agrégation des nanoparticules. Après environ un mois, on ne détecte toujours aucun agrégat dans les suspensions de concentrations supérieures à 2,5 g/L. En revanche, les suspensions contenant moins de 2,5 g/L de CeO_2 ne sont plus mesurables en DLS car l'intensité diffusée est nulle et ce aussi bien dans l'eau que dans l'acide nitrique. Les phénomènes de dissolution des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure (acidifiée ou non) prédominent, à long terme, sur les phénomènes d'agrégation.

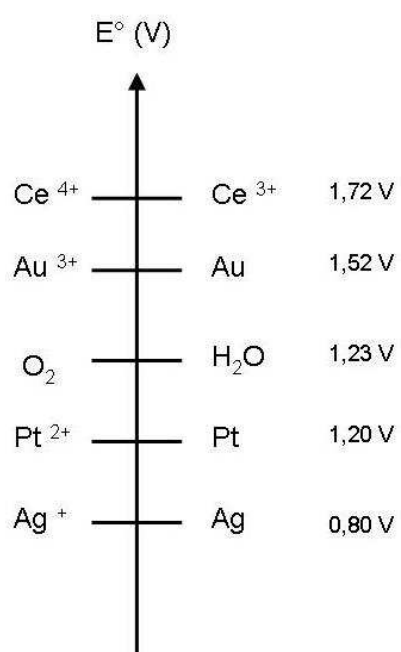


Figure 16 Echelle de potentiel de quelques couples d'éléments.

La dissolution partielle des nanoparticules de CeO_2 peut être en partie comprise en examinant le diagramme de stabilité potentiel/pH du cérium dans la fenêtre de l'eau. En effet, les nanoparticules de CeO_2 sont composées de cérium au degré d'oxydation 4, or la réduction au degré d'oxydation 3 produit des ions plus stables à bas pH. Le phénomène de dissolution observé est donc probablement lié à une réaction d'oxydoréduction transformant les atomes Ce^{IV} des nanoparticules en ions Ce^{3+} .

III.2.2 Oxydoréduction - Diagramme de Pourbaix

Le diagramme de Pourbaix théorique (ou diagramme potentiel-pH) du cérium permet de mieux comprendre les phénomènes redox mis en jeu dans les suspensions de nanoparticules. La partie ci-après présente les équations et constantes (voir également Figure 16) qui ont servi à établir ce diagramme (pour une description détaillée de l'établissement de ce diagramme voir en annexe).

- **Equations mises en jeu :**

	$E^\circ/V :$
$\text{Ce}(\text{OH})_2^{2+} + 2 \text{H}^+ + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Ce}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O}$	1,73
$\text{Ce}(\text{OH})^{3+} + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Ce}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	1,715
$\text{Ce}^{4+} + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Ce}^{3+}$	1,72
$\text{Ce}^{3+} + 3\text{e}^- \rightleftharpoons \text{Ce}$	-2,336
$\text{Ce}^{4+} + 4\text{OH}^- \rightleftharpoons \text{Ce}(\text{OH})_4 \text{ (précipité)}$	$K_s = 10^{-51}$
$\text{Ce}^{3+} + 3\text{OH}^- \rightleftharpoons \text{Ce}(\text{OH})_3 \text{ (précipité)}$	$K_s = 10^{-21}$
H_2O	$K_e = 10^{-14}$

- **Equations de précipitation :**

$$\begin{aligned} \circ \quad \text{Ce}^{3+} + 3\text{OH}^- &\rightleftharpoons \text{Ce}(\text{OH})_3 \text{ (s)} : & pH_1 &= \frac{21}{3} - \frac{1}{3} \log[\text{Ce}^{3+}] \\ \circ \quad \text{Ce}^{4+} + 4\text{OH}^- &\rightleftharpoons \text{Ce}(\text{OH})_4 \text{ (s)} : & pH_2 &= 1,25 - \frac{1}{4} \log[\text{Ce}^{4+}] \end{aligned}$$

- **Equations des potentiels d'oxydoréduction**

$$\circ \quad \text{Ce}^{4+} / \text{Ce}^{3+} : \quad E_1 = E_{\text{Ce}^{4+} / \text{Ce}^{3+}}^0 = 1,72$$

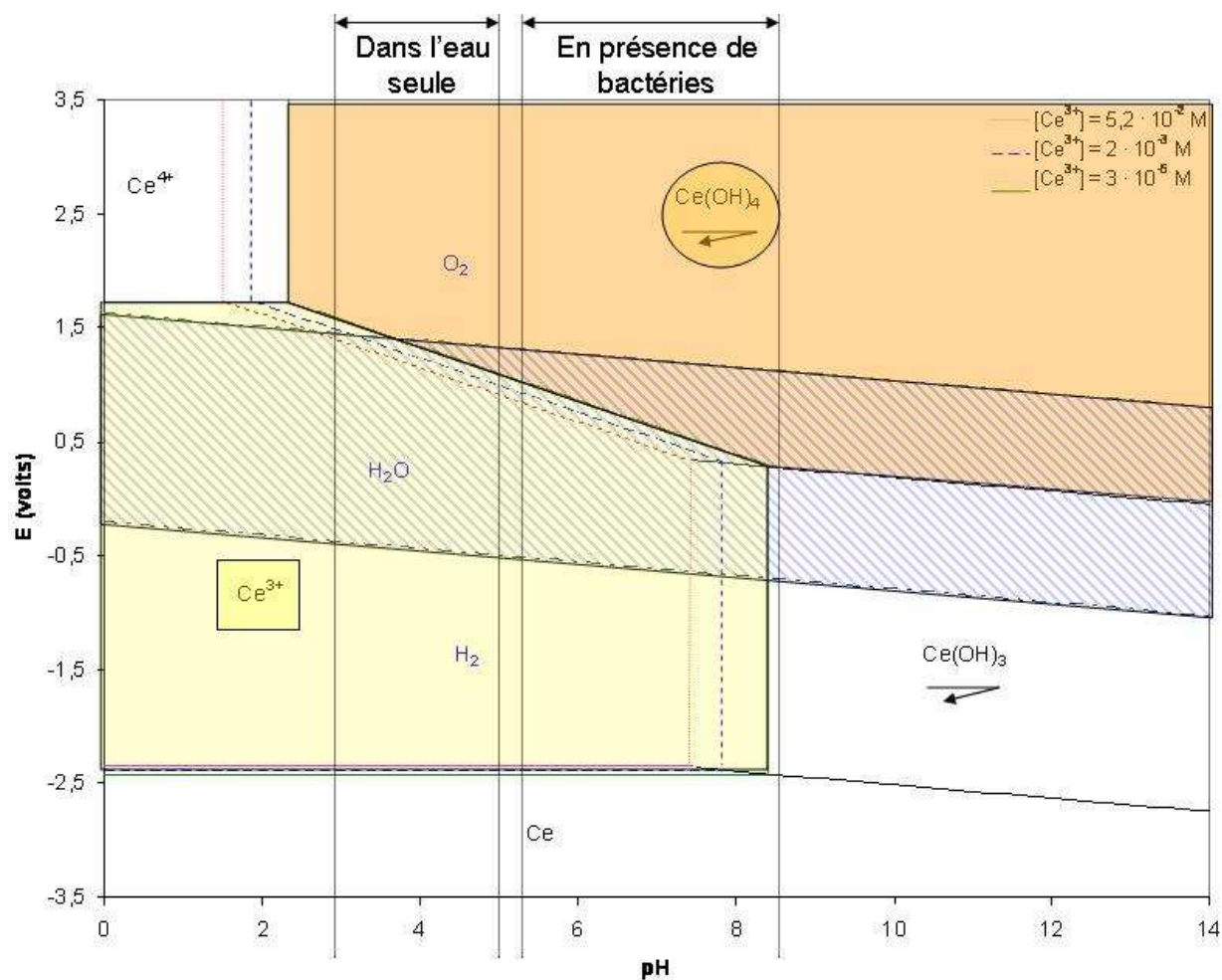


Figure 17 Diagramme potentiel – pH du cérium établi pour trois concentrations de cérium.

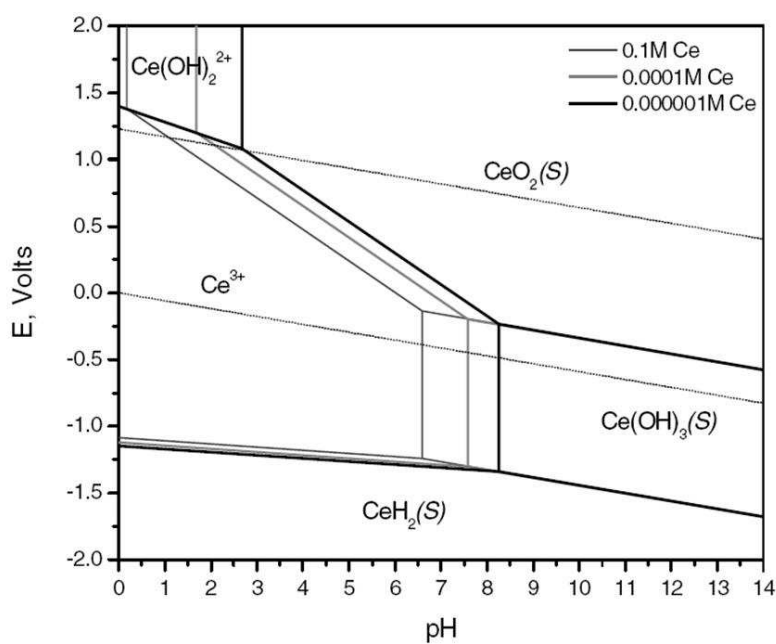


Figure 18 Diagramme potentiel-pH, de différentes espèces solubles, décrit par Tamilmani et al. 2003 (logiciel STABCAL).

- $\text{Ce}^{3+} / \text{Ce}$: $E_2 = -2,336 + \frac{0,059}{3} \log[\text{Ce}^{3+}]$
- $\text{Ce(OH)}_3 / \text{Ce}$: $E_3 = -1,92 - 0,059 \text{ pH}$
- $\text{Ce(OH)}_4 / \text{Ce}^{3+}$: $E_4 = 2,015 - 0,236 \text{ pH} - 0,059 \log[\text{Ce}^{3+}]$
- $\text{Ce(OH)}_4 / \text{Ce(OH)}_3$: $E_5 = 0,776 - 0,059 \text{ pH}$

Les équations $E = f(\text{pH})$ ont été établies pour trois concentrations différentes en Ce^{3+} : $C_1 = 5,18 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; $C_2 = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ et $C_3 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

- $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2$: $E_a = -0,059 \text{ pH}$
- $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$: $E_b = 1,229 - 0,059 \text{ pH}$

Pour des raisons cinétiques : $E_b + 0,4 \text{ V} \leq \text{zone de stabilité de l'eau} \leq E_a - 0,2 \text{ V}$

• Interprétation

Le diagramme potentiel-pH obtenu pour le cérium (Figure 17) concorde globalement avec celui proposé par Tamilmani *et al.*, 2003 (Figure 18). Les différences proviennent d'un choix différent dans les espèces considérées. En effet, la zone du Ce(OH)_4 ne correspond pas exactement à celle du CeO_2 puisqu'il est hydraté par deux molécules d'eau. Ils font de plus apparaître l'espèce CeH_2 au lieu du Ce ce qui conduit à un diagramme à bas potentiel légèrement différent.

Les conclusions sont cependant identiques dans les deux cas :

- Ce^{3+} (dissous), Ce(OH)_4 et Ce(OH)_3 sont les trois espèces les plus stables dans la région de stabilité de l'eau (délimitée par les pointillés discontinus).
- Ce^{3+} prédomine aux pH très acides (inférieurs à 2) pour tous les potentiels de la zone de stabilité de l'eau.
- Ce(OH)_4 est stable en milieu acide ($2 < \text{pH} < 7$), où il coexiste avec Ce^{3+} et en milieux neutre et basique où il coexiste avec Ce(OH)_3 .

Plus la suspension est concentrée en cérium, plus la zone de stabilité dans l'eau de Ce(OH)_4 (et donc de CeO_2) est agrandie. Ainsi, un pH acide favorise la dissolution de l'oxyde en Ce^{3+} , mais une concentration élevée en cérium (même si elle rend le pH plus acide dans notre cas à cause de la présence d'acide nitrique) ainsi que des conditions oxydantes (eau bien aérée) favorisent la stabilité de l'oxyde. Dans les conditions de contact avec les cellules, les nanoparticules seront à un pH compris entre 4 et 7, ce qui, si on prend le cas de la zone de stabilité de l'eau, favorise la stabilité des nanoparticules.

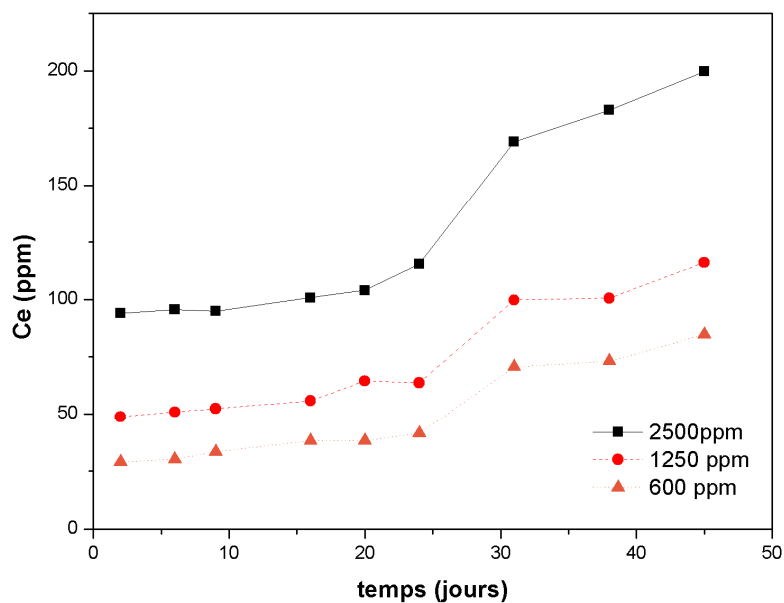


Figure 19 Cinétique de dissolution de trois suspensions de nanoparticules de concentrations : 2,5 ; 1,25 et 0,6 g/L de CeO_2 . Concentration en cérium dissout au cours du temps.

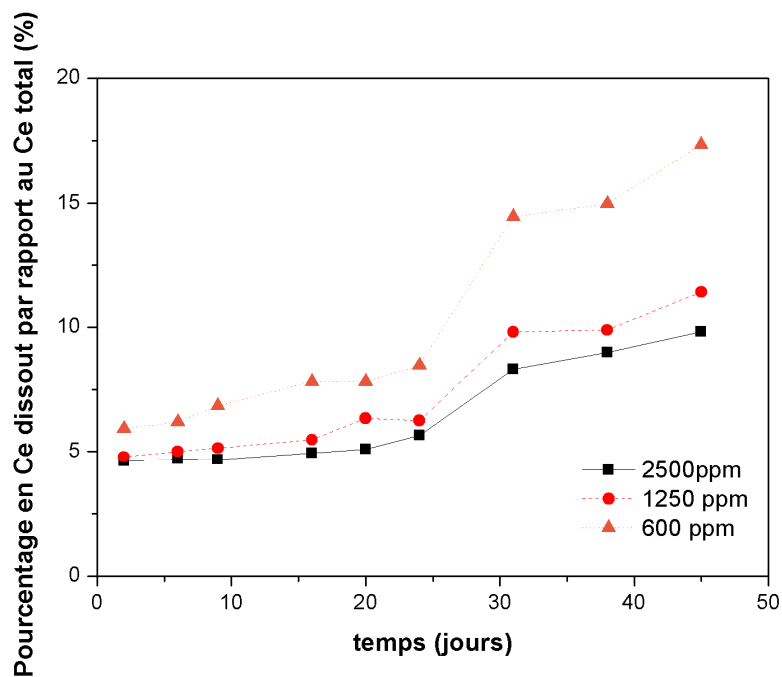


Figure 20 Cinétique de dissolution de trois suspensions de nanoparticules de concentrations : 2,5 ; 1,25 et 0,6 g/L de CeO_2 . Concentration en pourcentage de cérium dissout par rapport au cérium total au cours du temps.

Notons cependant que ce diagramme ne fournit qu'une interprétation théorique des réactions Redox mises en jeu et ne prend pas en compte la cinétique de ces réactions. Une seconde étape consiste donc à mesurer la solubilité au cours du temps à différents pH et concentrations.

III.2.3 Suivi cinétique de la dissolution par ICP-MS

Les suspensions suivies en cinétique par ICP-MS (spectromètre de masse quadripolaire à source plasma) ont les concentrations suivantes en cérium : $1,45 \cdot 10^{-2}$ M ; $7,3 \cdot 10^{-3}$ M ; et $3,5 \cdot 10^{-3}$ M (pH entre 3,5 et 4,5). Elles se situent donc entre les deux concentrations les plus élevées du diagramme de la Figure 17. Aux pH de l'étude, il y a donc coexistence entre l'oxyde de cérium CeO_2 et l'ion Ce^{3+} . Des prélèvements de ces suspensions ont été réalisés puis ultrafiltrés à intervalles de temps réguliers pendant 45 jours et les filtrats analysés par ICP-MS.

Les Figure 19 et Figure 20 présentent la concentration en ions Ce^{3+} dosés en solution en fonction du temps et de la concentration initiale en nanoparticules. La quantité de cérium dissous dépend de la concentration initiale de la suspension de nanoparticules et donc également du pH. En effet, à mesure que celui-ci diminue, la quantité de cérium dissous augmente (Figure 19). Cette observation est en accord avec le diagramme de Pourbaix qui montre une prépondérance de la forme Ce^{3+} aux pH acides. Cependant, la fraction dissoute représente une fraction de plus en plus grande à mesure que la concentration initiale diminue. Pour la suspension la plus diluée (0,6 g/L) quasiment 20 % des atomes sont solubilisés en 45 jours (Figure 20). Cela expliquerait donc pourquoi les dilutions de nanoparticules les plus faibles (inférieurs à 2,5 g/L) n'étaient plus mesurables en DLS après quelques semaines.

III.2.4 Modèle de réduction/dissolution

Afin de vérifier si la dissolution des nanoparticules est effectivement couplée à des phénomènes d'oxydoréduction, nous avons utilisé la spectroscopie des photoélectrons induits par rayons X (XPS). C'est en effet une technique d'analyse adaptée à la mesure de l'état d'oxydoréduction des atomes de surface. Pour réaliser ces expériences, des lamelles de mica ont été recouvertes d'une monocouche de nanoparticules d'oxyde de cérium (voir matériels et méthodes). Les interactions entre les nanoparticules et le mica sont irréversibles dans les conditions de l'expérience (Spalla and Kekicheff, 1997). Les micas recouverts de nanoparticules ont séjournés dans l'eau ultrapure pendant des durées déterminées (de 5 min à

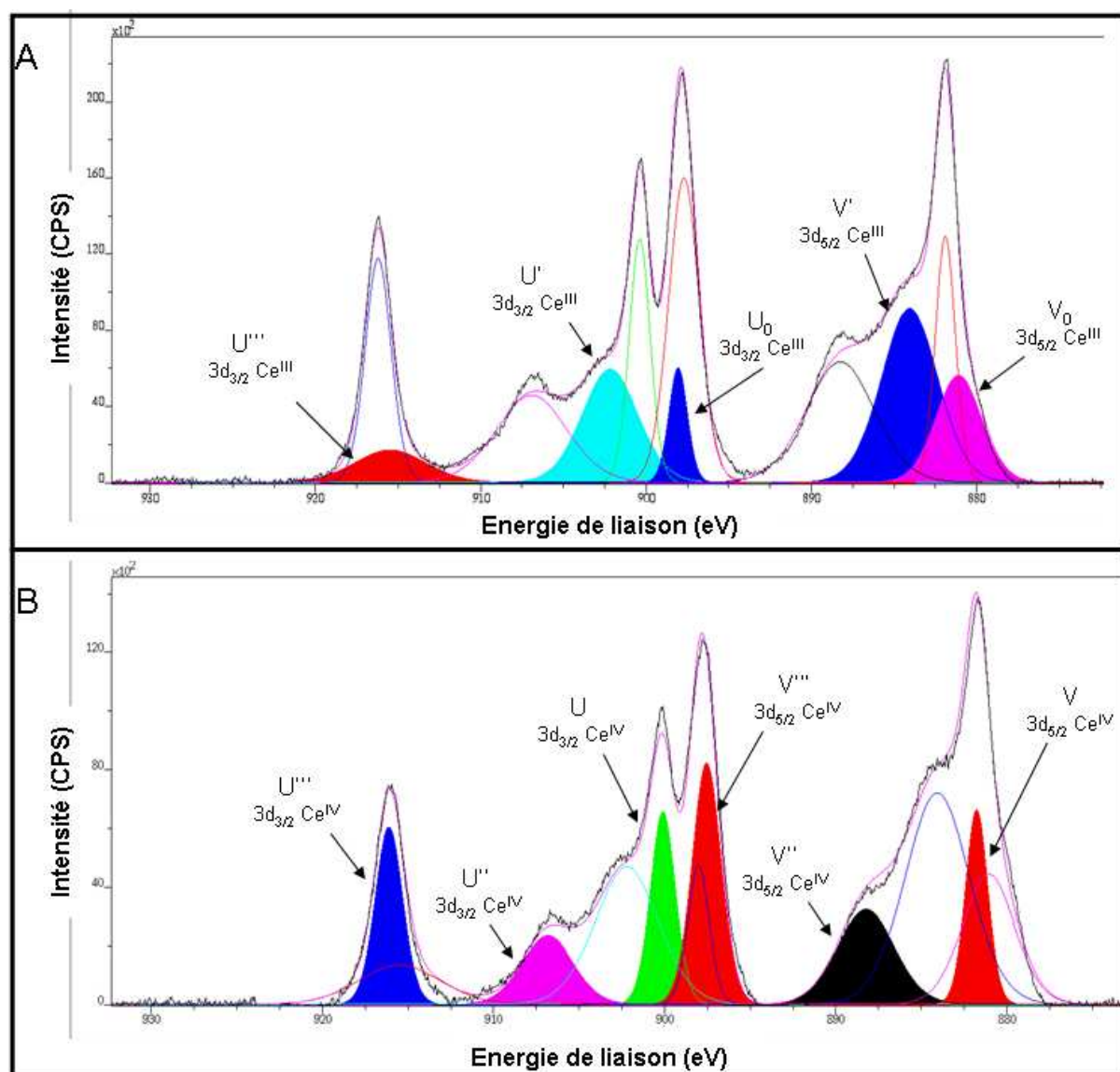


Figure 21 Spectres XPS de mica recouvert de NPs de CeO_2 couvrant la zone d'énergie 3d du cérium. Les pics pleins du modèle représentent les pics attribués pour A : au Ce^{III} et B : au Ce^{IV} .

3h). Après ce temps d'incubation, les lamelles ont été rincées puis séchées avant d'être analysées en XPS. Le faisceau de l'XPS a une profondeur typique d'irradiation dans un solide de quelques μm . Par contre les photoélectrons de faible énergie émergent d'une profondeur de quelques nanomètres seulement. Une monocouche de nanoparticules de CeO_2 faisant au maximum 7 nm, l'XPS est donc une technique totalement adaptée à ce type d'analyse de surface car l'ensemble de la nanoparticule est mesuré.

Un exemple de spectres obtenus par XPS (source Al $K\alpha$ 1486,6 eV) est montré Figure 21. Les spectres représentent la variation d'amplitude d'intensité (nombre de coups) en fonction de l'énergie de liaison (eV). Ces spectres, une fois le bruit de fond retiré (méthode Shirley du bruit de fond non linéaire), ont été modélisés à l'aide du logiciel Vision processing à partir des données sur les pics de photoémission du cérium trouvées dans la littérature (Zhang *et al.*, 2004 et Mullins *et al.*, 1998). La méthode de modélisation consiste à définir des rapports entre chaque pic de photoémission du Ce^{III} et du Ce^{IV} , puis de faire varier proportionnellement tous les pics appartenant au même ensemble (Ce^{III} ou Ce^{IV}). La position des pics reste fixe. La Figure 21 montre deux exemples de spectres XPS de la zone correspondant au niveau énergétique 3d du cérium. Les échantillons A et B sont des lamelles de mica recouvertes de nanoparticules de CeO_2 et ayant incubé pendant des durées différentes dans l'eau. Entre le spectre A (incubation 1h dans l'eau) et le spectre B (incubation 3h dans l'eau) on observe une augmentation de la concentration en Ce^{III} pour le spectre B. Cela se traduit par une diminution de l'amplitude des pics U''' , U'' , U , V'' , V''' et V .

La quantification des espèces présentes est réalisée par intégration de l'aire sous la courbe de chaque pic de photoémission correspondant à une espèce donnée (Ce^{III} ou Ce^{IV} dans le cas présent). Les aires obtenues sont normalisées par rapport à l'aire du pic de photoémission 2s du silicium. Celui-ci sert en effet d'étalon interne car il est présent en concentration constante dans le mica. Les données obtenues lors du suivi cinétique sont présentées dans le Tableau 3. La concentration en cérium diminue au cours du temps. De plus, la quantité de cérium au degré d'oxydation 4 est quatre fois plus faible après 2h d'incubation dans l'eau. En revanche la quantité de cérium au degré d'oxydation 3 diminue légèrement pendant les premières 30 minutes puis reste constante. Ces observations suggèrent un modèle de réduction-dissolution des nanoparticules. Les nanoparticules sont modélisées (Figure 22), par des cylindres de diamètre 7 nm et de hauteur 1,75 nm. Notons néanmoins que le volume de cette géométrie est

Nom	Volume de contact (ml)	Aire Ce^{IV}	Aire Ce^{III}	Aire Si 2s	Ce total/Si	$\text{Ce}^{\text{IV}}/\text{Si}$	$\text{Ce}^{\text{III}}/\text{Si}$	$\text{CeIII}/\text{Cetotal}$
Cinétique 5 min	2	188940	113420	4898	62	39	23	0,38
Cinétique 30 min	2	140964	93542	6639	35	21	14	0,40
Cinétique 1h	2	148312	113749	7445	35	20	15	0,43
Cinétique 2h	2	74140	102513	7338	24	10	14	0,58

Tableau 3 - Tableau résumant les conditions des échantillons analysés pour la cinétique de dissolution.
Par colonne, de gauche à droite : le nom des échantillons, le volume d'eau ultrapure utilisée, l'aire intégrée correspondant aux pics d'émission 3d du Ce^{IV} , du Ce^{III} et 2s du Si. Les colonnes suivantes : rapport des aires du cérium total, Ce^{IV} et Ce^{III} par rapport à l'aire du silicium. Dernière colonne : rapport des aires entre le cérium au degré d'oxydation 3 et le cérium total.

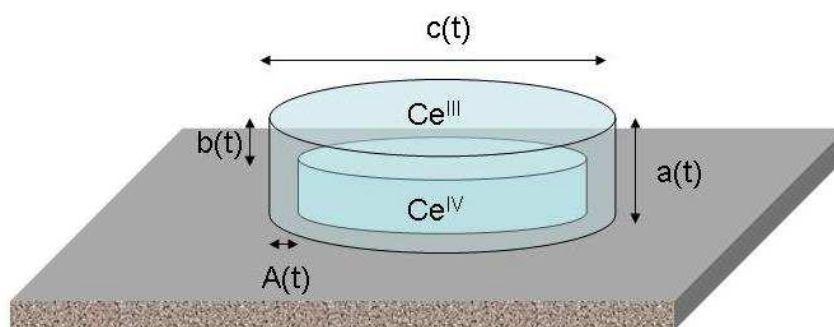


Figure 22 - Modélisation schématique d'une nanoparticule d'oxyde de cérium sur une couche de mica.
Le cœur de la nanoparticule est constitué de Ce^{IV} et sa surface de Ce^{III} . $A(t)$ est l'épaisseur latérale de la couche de Ce^{III} , $a(t)$ est la hauteur totale de la nanoparticule, $c(t)$ son diamètre et $b(t)$ la hauteur de la couche de Ce^{III} .

	$a(t)$ hauteur totale de la NP (nm)	$c(t)$ rayon de la NP (nm)	$b(t)$ hauteur de la couche de CeIII (nm)	$A(t)$ épaisseur de la couche de CeIII (nm)
Cinétique 5 min	1,7	3,4	0,5	0,4
Cinétique 30 min	1,3	2,9	0,4	0,4
Cinétique 1h	1,3	2,9	0,3	1,2
Cinétique 2h	1,0	2,8	0,5	0,6

Tableau 4 - Résultat de la modélisation de la réduction-dissolution d'une nanoparticule d'oxyde de cérium.

légèrement surestimé par comparaison à celui déduit des mesures SAXS. Le modèle est établi comme suit :

- Variables : $A(t)$, $a(t)$, $b(t)$ et $c(t)$, dimensions caractéristiques de la nanoparticule,
- Données : les rapports des aires intégrées à partir des spectres de photoémission

$$\alpha = \frac{Ce^{III}}{Si}, \beta = \frac{Ce^{IV}}{Si} \text{ et } \gamma = \frac{Ce^{III}}{Ce_{total}},$$

- Equations :

$$V_{Ce^{III}} = \pi b(t)c(t)^2 + 2\pi A(t)(a(t) - b(t))$$

$$V_{Ce^{IV}} = \pi a(t)c(t)^2 - V_{Ce^{III}}$$

- Restrictions : (avec $\sigma(a,b)$: écart-type entre a et b)

$$b(t) \leq a(t)$$

$$A(t) \leq c(t)$$

$$a(t) \geq a(t+n)$$

$$\sigma\left(\frac{V_{Ce^{III}}}{V_{Ce^{III}} + V_{Ce^{IV}}}; \gamma\right) = \min$$

$$\sigma(V_{Ce^{III}}; \alpha) = \min$$

$$\sigma(V_{Ce^{IV}}; \beta) = \min$$

Les résultats (Tableau 4), obtenus par itérations successives, montrent une diminution progressive de la hauteur $a(t)$ de la nanoparticule au cours du temps, jusqu'à atteindre presque la moitié de sa taille initiale. En revanche, le diamètre $c(t)$ de la nanoparticule semble peu varier au cours du temps.

Cette modélisation suggère deux phénomènes parallèles : une réduction de Ce^{IV} en Ce^{III} à l'interface entre la nanoparticule et l'eau et une dissolution du Ce^{III} libéré sous forme de Ce^{3+} en solution. Il est probable que les nanoparticules de CeO_2 soient recouvertes d'une couche d'épaisseur constante de cérium au degré d'oxydation 3 similaire aux couches de passivation existantes chez certains métaux (ex : aluminium) (Figure 23). Conjointement à ce phénomène, les atomes de Ce^{III} subissent un phénomène de dissolution qui les libère sous forme d'ions Ce^{3+} en solution. La cinétique de dissolution dépend du volume d'eau, de la concentration en nanoparticules et de celle des ions en solution.

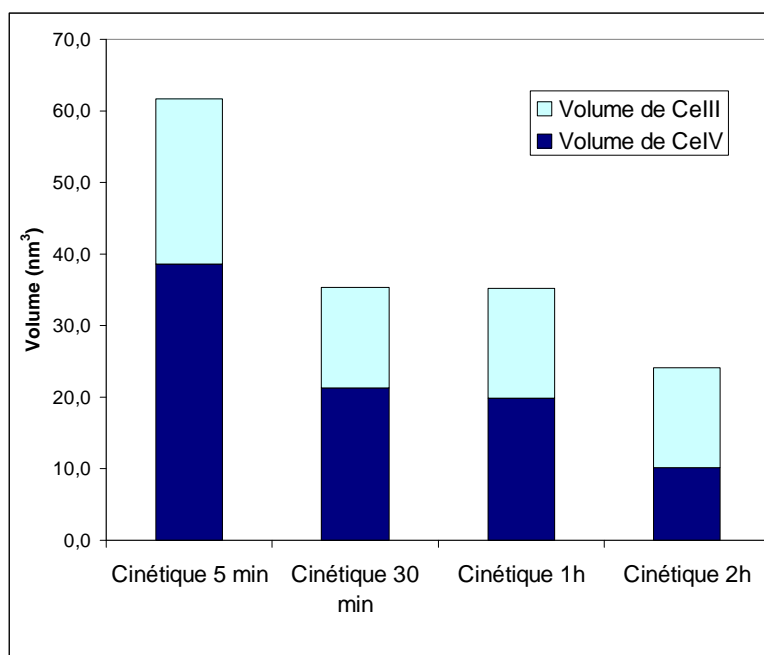


Figure 23 - Evolution du volume d'une nanoparticule de CeO_2 et du volume de Ce^{III} présent dans la nanoparticule en fonction du temps dans l'eau ultrapure.

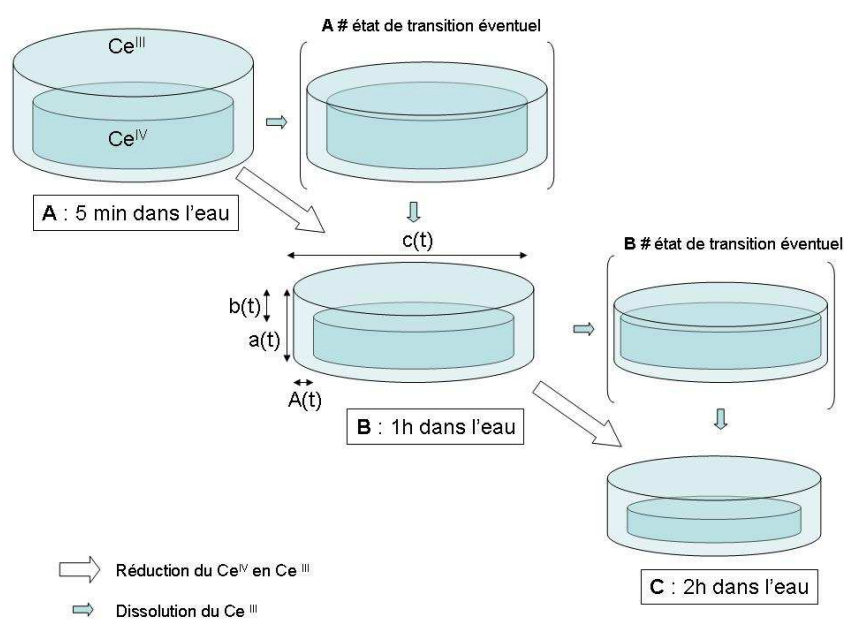


Figure 24 - Proposition d'un modèle de réduction-dissolution d'une nanoparticule de CeO_2 au cours du temps dans l'eau.

La Figure 24 propose un schéma de dissolution d'une nanoparticule de CeO_2 dans l'eau d'après les données de la modélisation (Tableau 4). La nanoparticule conserve un diamètre pratiquement inchangé en revanche son épaisseur diminue fortement au cours du temps. La quantité de cérium au degré d'oxydation 4 diminue tandis que la couche de cérium au degré d'oxydation 3 reste quasiment constante. Cela confirme l'hypothèse faite sur les mesures DLS (III. 2.1), à savoir que la diminution de volume affectant uniquement l'épaisseur de la nanoparticule, le diamètre hydrodynamique mesuré reste identique.

En revanche, on constate qu'après seulement 2h d'incubation dans l'eau plus de la moitié de la nanoparticule a été dissoute. Les mesures d'ICP ne montraient pas de telles concentrations dissoutes. Cependant les conditions sont différentes car dans le cas présent la concentration maximale en nanoparticules est de 1,5 ppm (quantité de nanoparticules comprise sur les deux faces du disque de mica de diamètre 1 cm et plongées dans 2 ml d'eau) tandis que la concentration minimum étudiée en ICP était de 600 ppm. A cette concentration, 400 fois plus élevée, la solution contenait déjà 30 ppm de Ce^{3+} dissous après 24 h. Ceci représente 20 fois plus que la concentration initiale des échantillons analysés en XPS et justifie l'importante diminution de volume des nanoparticules dans des conditions beaucoup plus diluées.

A cause de ces phénomènes de dissolution, les expériences (floculation, tests de survie, etc.) ont par la suite été réalisées dans cette étude à partir de suspensions de CeO_2 à 10 g/L âgées au maximum de deux jours et diluées quelques minutes seulement avant la mise en contact avec les bactéries. La concentration maximale en ions Ce^{3+} dissous ne devait donc pas dépasser 5 % de la concentration totale en cérium.

III.3 Matériels et méthodes

III.3.1 Diffusion de lumière dynamique (DLS)

Les mesures DLS ont été effectuées sur un nanosizer nanoZS de marque Malvern. Les suspensions de nanoparticules ont été introduites dans des cuves de spectroscopie en plastique jetable, puis les mesures ont été répétées plusieurs fois à différentes dilutions et en modes multimodale et monomodale (différents modèles de calcul permettant de déduire directement le rayon hydrodynamique moyen d'après la modélisation de la courbe de corrélation). Toutes les mesures sont données en diamètre hydrodynamique et les distributions en fraction volumique.

Les échantillons contenant des nanoparticules et différents pourcentages de MM ont été obtenus par ajout de 1 g d'une solution de nanoparticules à 10 g/L à 1 g d'une solution de MM sans hépès (agent tamponnant) diluée à différentes concentrations. L'échantillon le plus concentré contenait donc : 5 g/L de nanoparticules et 50 % de MM. Pour les échantillons contenant des sels du milieu MM, 1 g du double de la concentration en sels du MM a été ajouté à 1 g d'une suspension de nanoparticules à 10g/L. Les échantillons finaux avaient la composition suivante : sels (concentration dans le MM), nanoparticules (5 g/L).

III.3.2 Spectrométrie de masse quadripolaire à source plasma (ICP-MS)

Une suspension de nanoparticules de CeO_2 a été préparée dans l'eau ultrapure puis diluée de deux en deux afin d'obtenir un stock de trois suspensions de concentrations : 2,5 g/L, 1,25 g/L et 0,6 g/L.

À intervalles de temps réguliers, 15 mL de chacune des solutions ont été prélevés et ultrafiltrés dans une cellule d'ultrafiltration Amilcon sur membrane YM10 ; 10 kDa en cellulose régénérée. La cinétique a été effectuée sur 45 jours, ce qui a correspondu à 9 dates de prélèvement et ultrafiltration pour les 3 solutions.

Une série de prélèvements a également été filtrée en parallèle sur filtre 5 kDa afin de vérifier si aucune nanoparticule ne pouvait passer à travers les pores de la membrane 10 kDa. La comparaison des concentrations obtenues sur les deux séries n'a montré aucune différence. Les nanoparticules n'ont donc pas passé la membrane et les filtrats obtenus étaient dépourvus de nanoparticules. Les filtrats obtenus étaient trop concentrés pour pouvoir être analysés

directement en ICP-MS et ils ont donc été préalablement dilués 10^6 fois dans l'acide chlorhydrique à 2 % (deux dilutions successives : 0,2 g dans 50 g puis 0,5g dans 50 g). Une série de solutions étalons a également été préparée.

Les échantillons ont été analysés sur ICP-MS Thermoelectron X7 équipé d'un passeur d'échantillons automatique type (AS 90).

III.3.3 Spectroscopie de photoélectron X (XPS)

Les dépôts d'oxyde de cérium ont été préparés à partir de disques de mica de 10 mm de diamètre, et d'épaisseur 0,3 mm (CLSS Scratchless, Metafix). Les disques, préalablement clivés afin que leurs surfaces soient propres, sont placés pendant 1h dans une suspension de CeO_2 NPs à 20 g/L, puis rincés par trempage dans 3 bains différents d'acide nitrique (10^{-2} M).

Les dépôts destinés aux expériences de suivi cinétique de dissolution ont été directement placés dans des tubes en plastique contenant de l'eau ultrapure et agités pendant 5 min, 30 min, 1h et 2h. Une fois les temps d'incubation respectifs écoulés, les disques ont été séchés à l'étuve à 80 °C avant d'être analysés en XPS.

Les disques destinés aux expériences de mise en contact avec les bactéries ont été placés pendant 3 h dans des tubes en plastique contenant soit : *E. coli* dans l'eau ultrapure, soit *Synechocystis* dans l'eau ultrapure, soit *E. coli* dans le LB, soit *Synechocystis* dans le MM, soit du LB, soit du MM, soit de l'eau ultrapure. Les cultures ont préalablement été préparées de la façon décrite dans la partie « préparation des cultures ». Pendant les trois heures d'incubation, les échantillons ont été placés dans l'incubateur agité à 37 °C à l'obscurité pour les cultures contenant *E. coli* ou du LB, et à 30 °C à 2500 lux pour les tubes contenant *Synechocystis*, du MM ou de l'eau. Les échantillons ont ensuite été rapidement rincés à l'eau ultrapure et séchés à l'étuve à 80 °C avant d'être analysés en XPS.

Les analyses XPS ont été effectuées sur un AXIS ULTRA DLD fabriqué par Kratos Analytical. La pression dans la chambre d'analyse est de $3 \cdot 10^{-10}$ mbar. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une source Aluminium monochromatisée dont la raie $K\alpha_1$ émet à 1486,6eV et les spectres des niveaux de cœur ont été enregistrés avec une énergie de passage de 20eV. La détection des photoélectrons se fait à 90 degrés par rapport à la surface de l'échantillon. La résolution en énergie ainsi obtenue est de 0,4 eV sur la raie $\text{Si}2p^{3/2}$.

Les données ont été traitées avec le logiciel Vision Processing. Les zones du spectre correspondantes aux pics de photoémission 3d (entre 870 et 930 eV d'énergie de liaison) et 4d (entre 100 et 130 eV d'énergie de liaison) du cérium ont été analysées par combinaison linéaire des pics du Ce^{IV} et Ce^{III} selon le procédé décrit par Zangh 2004 et Mullins 1998. L'étalon interne était le pic 2 s du silicium (présent dans le mica) entre 140 et 160 eV.

III.4 Références bibliographiques

- [Bermudez *et al.*, 2004] Bermudez, E., Mangum, J. B., Wong, B. A., Asgharian, B., Hext, P. M., Warheit, D. B., and Everitt, J. I. (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicological Sciences*, 77(2):347–357.
- [Berry *et al.*, 2004] Berry, C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G., and Curtis, A. (2004). Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, 25:5405–5413.
- [Brunner *et al.*, 2006] Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., and Stark, W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 40(14):4374–4381.
- [Derfus *et al.*, 2004] Derfus, A., Chan, W. C. W., and Bhatia, S. N. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*, 4:11–18.
- [Franklin *et al.*, 2007] Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., and Casey, P. S. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41(24):8484–8490.
- [Limbach *et al.*, 2005] Limbach, L. K., Li, Y., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M., Gunther, D., and Stark, W. J. (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental Sciences & Technologies*, 39(23):9370–9376.
- [Meulenkaamp, 1998] Meulenkaamp, E. A. (1998). Size dependence of the dissolution of ZnO nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 102(40):7764–7769.
- [Mullins *et al.*, 1998] Mullins, D. R., Overbury, S. H., and Huntley, D. R. (1998). Electron spectroscopy of single crystal and polycrystalline cerium oxide surfaces. *Surface Science*, 409(2):307–319.
- [Pollmann *et al.*, 2006] Pollmann, K., Raff, J., Merroun, M., Fahmy, K., and Selenska-Pobell, S. (2006). Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnology Advances*, 24:56–68.

- [Spalla, 2002] Spalla, O. (2002). Nanoparticle interactions with polymers and polyelectrolytes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(3-4):179–185.
- [Spalla and Kekicheff, 1997] Spalla, O. and Kekicheff, P. (1997). Adhesion between oxide nanoparticles: Influence of surface complexation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 192(1):43–65.
- [Tamilmani *et al.*, 2003] Tamilmani, S., Shan, J., Huang, W., Raghavan, S., Small, R., Shang, C., and Scott, B. (2003). Interaction between ceria and hydroxylamine. *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 767:161–166.
- [Zhang *et al.*, 2004] Zhang, F., Wang, P., Koberstein, J., Khalid, S., and Chan, S. W. (2004). Cerium oxidation state in ceria nanoparticles studied with X-ray photoelectron spectroscopy and absorption near edge spectroscopy. *Surface Science*, 563(1-3):74–82.

Résumé des principaux résultats du chapitre III : physicochimie des nanoparticules

Les nanoparticules de CeO_2 sont soumises à différents processus d'instabilité physicochimique qui jouent un rôle important lors des tests en présence de cellules.

- ***Agrégation***

Les NPs de CeO_2 s'agrègent rapidement en présence de sels et notamment ceux constitutifs des milieux de culture MM et LB. Afin d'éviter ce phénomène, certains tests sont réalisés dans de l'eau ultrapure.

- ***Solubilisation***

Par analyses ICP-MS nous avons démontré que la quantité de cérium dissous augmente avec la diminution du pH des suspensions. Les suspensions très faiblement concentrées en nanoparticules ($<2,5$ g/L) ne sont donc pas conservables plus d'une dizaine de jours.

- ***Oxydoréduction***

D'après l'établissement du diagramme de Pourbaix ($E=f(\text{pH})$), le Ce^{IV} des NPs coexiste avec le Ce^{III} dans le domaine de stabilité de l'eau. L'équilibre est déplacé en faveur du Ce^{III} aux pH acides.

Des expériences XANES démontrent en effet la présence d'une couche de « passivation » de Ce^{III} en surface des NPs de CeO_2 . Cette couche se dissout au cours du temps et se reforme continûment par réduction du Ce^{IV} au contact de l'eau.

IV. Physicochimie des interactions entre nanoparticules et cellules.

Table des matières du chapitre IV : Physicochimie des interactions entre nanoparticules et cellules

IV.	Physicochimie des interactions entre nanoparticules et cellules.	141
IV.1	Echelle macroscopique : floculation cellulaire en présence de nanoparticules	145
IV.1.1	Observation de la floculation en présence de nanoparticules	145
IV.1.1.1	Synechocystis	145
IV.1.1.2	E. coli	147
IV.1.1.3	Conclusion sur les phénomènes de floculation	149
IV.1.2	Impact de la floculation dans un contexte environnemental	149
IV.1.2.1	Floculation artificielle : la dépollution	149
IV.1.2.2	Impact de la floculation due aux nanoparticules	151
IV.2	Echelle microscopique : interactions spécifiques à chaque modèle biologique	153
IV.2.1	Différents modèles d'adsorption des nanoparticules sur les cellules	153
IV.2.1.1	Isothermes d'adsorption	153
IV.2.1.2	Mobilité électrophorétique	157
IV.2.1.3	Discussion sur les différents modèles d'adsorption	159
IV.2.2	Localisation à l'échelle de la cellule	161
IV.2.2.1	Microscopie électronique en transmission	161
IV.2.2.2	Cartographie XEDS	163
IV.2.3	Influence des exopolysaccharides (EPS) de <i>Synechocystis</i>	169
IV.2.3.1	Définition et rôle des EPS microbiens	169
IV.2.3.2	Visualisation des EPS en microscopie optique	173
IV.2.3.3	Visualisation des interactions EPS-NPs en cartographie XEDS	177
IV.2.3.4	Conclusion sur l'influence des EPS lors d'une mise en contact avec des NPs	181
IV.3	Mécanismes d'oxydoréduction lors d'un contact nanoparticules/cellules	185
IV.3.1	Analyses XPS	185
IV.3.2	Analyses XANES	187
IV.3.3	Conclusions sur les mécanismes d'oxydoréduction	191
IV.4	Matériels et méthodes	195
IV.4.1	Electrophorèse capillaire	195
IV.4.2	Mobilité électrophorétique	197
IV.4.3	Microscopie électronique en transmission (MET)	199
IV.4.4	Microscopie électronique à balayage (MEB)	199
IV.4.5	Analyse dispersive en énergie (XEDS)	201
IV.4.6	Spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES)	203
IV.5	Références bibliographiques	205

IV.1 Echelle macroscopique : floculation cellulaire en présence de nanoparticules

IV.1.1 Observation de la floculation en présence de nanoparticules

Les cultures de *Synechocystis* et *E. coli* ont été exposées pendant des durées variables à une gamme de suspensions de nanoparticules de concentration croissante afin d'analyser l'influence des nanoparticules sur leur physiologie. Lors des expériences présentées dans cette partie, les cultures ont été lavées (voir matériels et méthodes, chapitre II.3.3) dans le milieu étudié, puis mises en contact sous agitation (vortex) avec une quantité donnée de nanoparticules ou d'ions cérium. La comparaison avec les ions cérium permet de dissocier les effets dus à la taille des particules des effets de composition. On observe une floculation rapide après 1 à 20 minutes de contact avec les nanoparticules. Les cultures sont restées dans l'état floculé même après une tentative de remise en suspension par simple agitation manuelle.

IV.1.1.1 *Synechocystis*

- **Milieu de culture + nanoparticules**

Les cultures de *Synechocystis* sont lavées dans leur milieu de culture (MM) puis mises en présence de nanoparticules d'oxyde de cérium (Photo 8). Les cultures contenant les concentrations les plus élevées en nanoparticules (supérieures à 120 ppm de CeO_2) floculent en une dizaine de minutes. Les floes ont un aspect de gel non compact. Les cultures contenant des concentrations de CeO_2 inférieures à 120 ppm présentent une floculation très limitée (quelques floes épars dans une culture stabilisée).

- **Eau ultrapure + nanoparticules**

La fenêtre de floculation (en concentrations de CeO_2) change lorsque le milieu de culture est remplacé par de l'eau ultrapure (Photo 9). En effet, les cultures entre 15 et 30 ppm de CeO_2 , floculent dans leur intégralité et sédimentent en une heure. En revanche, pour les concentrations supérieures à 30 ppm de CeO_2 , les cultures, apparemment stables, sont en réalité composées d'agréats, de taille inférieure au millimètre, formant une suspension

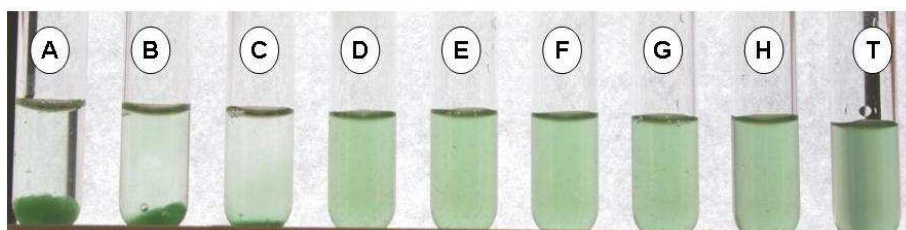


Photo 8 Floculation d'une culture de *Synechocystis* en contact 2h avec des CeO_2 NPs dans le milieu de culture MM.

Concentrations en CeO_2 de gauche à droite : A = 480 ppm ; B = 240 ppm ; C = 120 ppm ; D = 60 ppm ; E = 30 ppm ; F = 15 ppm ; G = 7,5 ppm ; H = 3,75 ppm ; T = 0 ppm.

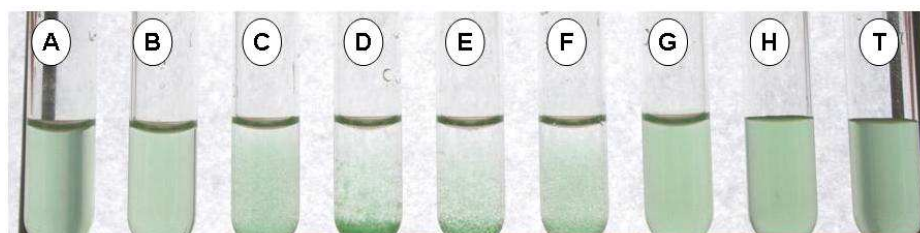


Photo 9 Floculation d'une culture de *Synechocystis* en contact 2h avec des CeO_2 NPs dans l'eau ultrapure.

Concentrations en CeO_2 de gauche à droite : A = 480 ppm ; B = 240 ppm ; C = 120 ppm ; D = 60 ppm ; E = 30 ppm ; F = 15 ppm ; G = 7,5 ppm ; H = 3,75 ppm ; T = 0 ppm.

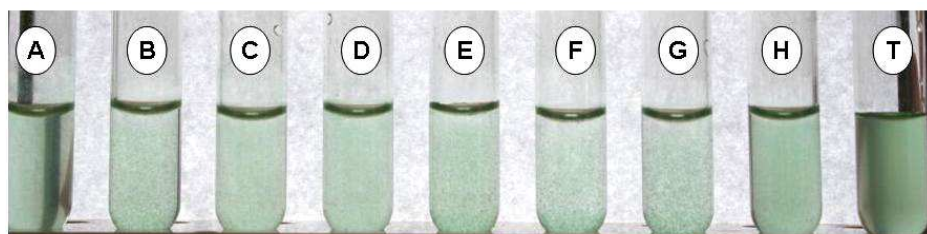


Photo 10 Floculation d'une culture de *Synechocystis* en contact 2h avec du $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ dans l'eau ultrapure.

Concentrations en Ce^{3+} de gauche à droite : A = 2,80 mM ; B = 1,40 mM ; C = 0,70 mM ; D = 0,35 mM ; E = 0,17 mM ; F = 0,09 mM ; G = 0,045 mM ; H = 0,02 mM ; T = 0 mM.

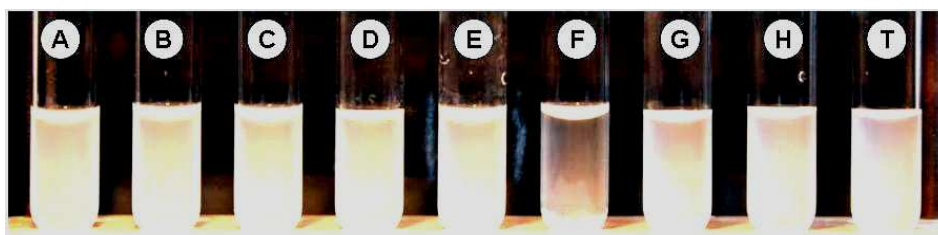


Photo 11 Floculation d'une culture de *E. coli* en contact 2h avec des CeO_2 NPs dans l'eau ultrapure.

Concentrations en CeO_2 de gauche à droite : A = 480 ppm ; B = 240 ppm ; C = 120 ppm ; D = 60 ppm ; E = 30 ppm ; F = 15 ppm ; G = 7,5 ppm ; H = 3,75 ppm ; T = 0 ppm.

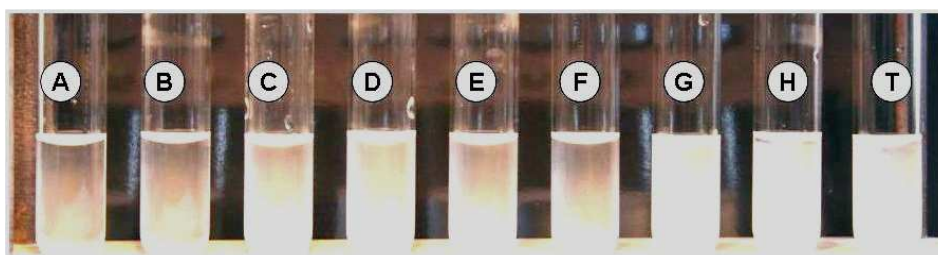


Photo 12 Floculation d'une culture de *E. coli* en contact 2h avec du $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ dans l'eau ultrapure.

Concentrations en Ce^{3+} de gauche à droite : A = 2,80 mM ; B = 1,40 mM ; C = 0,70 mM ; D = 0,35 mM ; E = 0,17 mM ; F = 0,09 mM ; G = 0,045 mM ; H = 0,02 mM ; T = 0 mM.

stable dans l'eau. Pour des concentrations inférieures à 15 ppm, aucun agrégat n'est observé. La gamme de concentration en nanoparticules pour laquelle il y a floculation et le type de floculation dépendent donc du milieu de contact.

- **Eau ultrapure + ions Ce^{3+}**

Les cultures de *Synechocystis* en présence d'ion cérium III (Photo 10) floculent en revanche pour l'ensemble des concentrations utilisées (petits flocs en suspension). Quelque soit le test présenté p.146, les lettres (de A à H) correspondent à la même concentration molaire en élément cérium.

IV.1.1.2 *E. coli*

- **Milieu de culture + nanoparticules**

Aucun phénomène de floculation n'est observé lorsque les bactéries d'*E. coli* sont mises en contact avec des nanoparticules dans leur milieu de culture (LB). Les nanoparticules sont sans doute agrégées à cause du sel, ou « passivées » par recouvrement par des molécules organiques du milieu avant d'atteindre les cellules.

- **Eau ultrapure + nanoparticules**

Contrairement au cas du contact dans le milieu de culture, on observe une zone de floculation et sédimentation rapide pour 15 ppm de CeO_2 dans l'eau et des suspensions stables d'agrégats pour des concentrations supérieures en nanoparticules (Photo 11). Ce phénomène est similaire à celui observé chez *Synechocystis*, cependant la zone fortement floculée avec décantation rapide des flocs est limitée à une seule concentration (15 ppm) chez *E. coli* contrairement à *Synechocystis* où cette fenêtre de concentrations est plus large.

- **Eau ultrapure + ions Ce^{3+}**

Contrairement au cas du contact avec les nanoparticules, où il existe une concentration pour laquelle la culture flocule puis sédimente rapidement, en présence d'ions cérium III, les cultures d'*E. coli* floculent pour un intervalle de concentrations comprises entre 2,40 mM et 0,09 mM (Photo 12). Cet intervalle de floculation est cependant moins étendu que dans le cas où *Synechocystis* est en contact avec les ions Ce^{3+} .

IV.1.1.3 Conclusion sur les phénomènes de floculation

Les expériences réalisées montrent que les cellules flocculent dans l'eau ultrapure et dans le milieu de culture, uniquement pour *Synechocystis*, en présence de nanoparticules de CeO₂. Les phénomènes de floculation observés dans l'eau synthétique modérément dure ne sont pas montrés ici mais ils ont été vérifiés et sont exactement identiques à ceux observés dans l'eau ultrapure pour les deux modèles cellulaires. Cet effet est commun à d'autres nanoparticules puisque l'on observe également de la floculation lors d'ajout de nanoparticules de rutile (TiO₂) et maghémite (Fe₂O₃) à des suspensions d'*E. coli* et *Synechocystis* (voir en annexe p.315). Cependant, la floculation est un phénomène rarement décrit lors des études de toxicité sur les bactéries.

Notons que les sels de Ce^{III} provoquent également des floculations et ce pour des gammes de concentrations plus étendues que pour les nanoparticules. Toutefois, et contrairement à ce qui est observé pour les nanoparticules, il n'existe aucune concentration pour laquelle les cultures sédimentent plus rapidement.

Ces phénomènes de floculation cellulaire semblent donc être à la fois associés à des phénomènes dus aux nanoparticules mais également aux particularités électroniques des ions cérium. La charge des ions cérium ainsi que celle des nanoparticules jouent vraisemblablement un rôle majeur dans la floculation. Ce phénomène n'a, à notre connaissance, jamais été décrit dans la littérature comme résultant de la présence de nanoparticules.

IV.1.2 Impact de la floculation dans un contexte environnemental

La floculation due à la présence de nanoparticules a été mise en évidence au laboratoire, on peut alors s'interroger sur l'impact d'une telle floculation replacée dans un contexte environnemental.

IV.1.2.1 Floculation artificielle : la dépollution

On peut tout d'abord remarquer que la floculation est notamment utilisée lors des traitements de dépollution dits par filières physico-chimiques. Celles-ci interviennent pour clarifier les eaux contenant des colloïdes, ce qui est le cas de la majorité des eaux superficielles. Ces colloïdes sont d'origine minérale (argile), végétale (acides humiques ou fulviques, algues), animale (zooplancton), humaine (suspension graisseuse) ou industrielles.

Ces traitements physico-chimiques peuvent être séparés en 3 étapes (Mouchet, 2000) :

- la coagulation : déstabilisation des particules colloïdales et formation d'agrégats constitués d'hydroxydes métalliques et de colloïdes
- la floculation : rassemblement des agrégats sous forme séparable de la phase aqueuse ;
- la séparation des phases solide et liquide: par décantation et filtration.

La difficulté de séparation des colloïdes vient de leur charge de surface (négative dans les eaux naturelles) qui leur assure une stabilité colloïdale par répulsion électrostatique (voir chapitre III.1). L'ajout de chlorure ferrique ou de sulfate d'aluminium dans une zone de pH où ces cations sont partiellement hydrolysés voire polymérisés (polycations) conduit à la formation d'un gel amorphe d'hydroxyde de fer ou d'aluminium, contenant les colloïdes, qui se présente sous forme de floes. Une fois les floes formés, il est nécessaire d'accroître leur volume, leur masse et leur cohésion. Différentes techniques sont disponibles et notamment le recours aux floculants aussi appelés adjuvants de coagulation (Mouchet, 2000).

Cette technique de coagulation-floculation permet ainsi la séparation et l'élimination des colloïdes, dont les microorganismes font partie, qui polluent l'eau.

IV.1.2.2 Impact de la floculation due aux nanoparticules

Nous avons vu que les traitements physico-chimiques des eaux usées utilisent des sels trivalents lors des étapes de coagulation et floculation des colloïdes. Dans notre étude, le nitrate de cérium ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$) est un ion trivalent, il peut donc provoquer des phénomènes de coagulation-floculation au même titre que le chlorure de fer. De la même manière, il est probable que les nanoparticules se comportent comme des ions multivalents et provoquent ainsi le phénomène de floculation. Replacé dans un contexte environnemental (ex : ruissellement de nanoparticules de CeO_2 dans un lac), ce phénomène de floculation aurait de graves conséquences sur la survie d'espèces microbiennes photosynthétiques. En effet, il conduirait à une décantation des bactéries photosynthétiques floculées qui, une fois privées de

lumière, mourraient par manque d'apport énergétique. Ceci aurait un impact sur toute la chaîne alimentaire aquatique ainsi que sur l'équilibre de la biosphère (cf. Chapitre II).

IV.2 Echelle microscopique : interactions spécifiques à chaque modèle biologique

IV.2.1 Différents modèles d'adsorption des nanoparticules sur les cellules

Les interactions cellules-nanoparticules induisent une floculation indépendamment du modèle bactérien. Sur la base des techniques utilisées de façon industrielle lors du traitement des eaux, nous avons postulé que les mécanismes de floculation due aux nanoparticules sont du même type que des floculations dues à la présence de sels trivalents.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons établi les isothermes d'adsorption des nanoparticules sur les bactéries ainsi que l'évolution de la mobilité électrophorétique de ces bactéries en présence d'une concentration croissante en nanoparticules.

IV.2.1.1 Isothermes d'adsorption

L'adsorption est le processus au cours duquel des molécules d'un fluide (gaz ou liquide) appelé adsorbat se fixent sur la surface d'un solide appelé adsorbant. Dans le cas présent, l'adsorbat est représenté par l'ensemble des nanoparticules et l'adsorbant par les bactéries. Il existe deux types d'adsorption : l'adsorption physique (ou physisorption) et l'adsorption chimique (ou chimisorption). Dans le cas de l'adsorption physique, la fixation se fait par les forces de Van der Waals et, lorsque l'adsorbant a une structure ionique, par les forces d'interactions électrostatiques (voir partie III). L'adsorption physique ne provoque pas de modification de la structure moléculaire et est réversible (par modifications des conditions de l'expérience : température, pression, pH, etc.). L'adsorption chimique se fait par des réactions chimiques entre l'adsorbat et l'adsorbant. Il y a création d'énergies de liaison beaucoup plus fortes que dans le cas de l'adsorption physique, ce qui rend les adsorptions chimiques quasi-irréversibles.

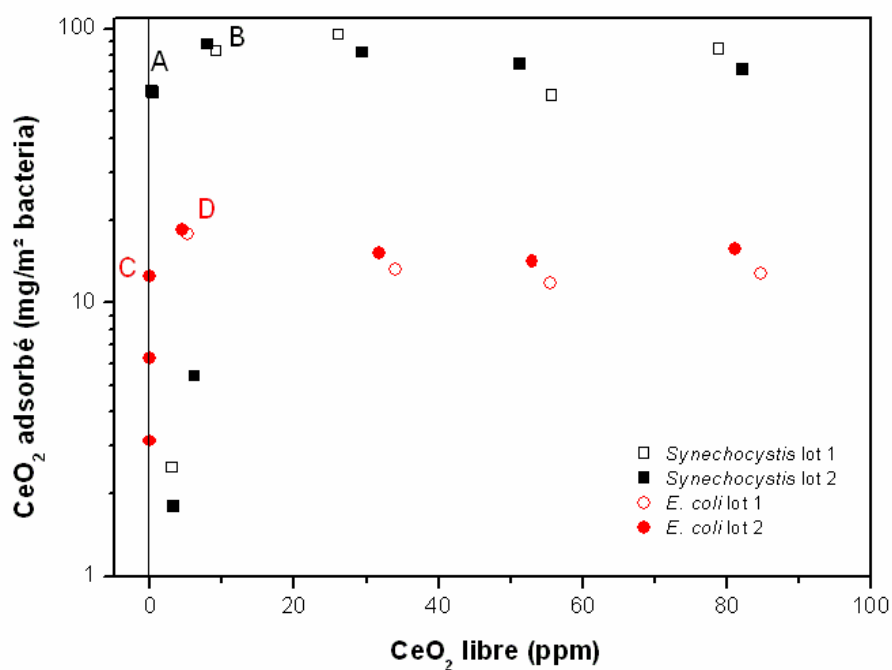


Figure 25 Isothermes d'adsorption de *Synechocystis* et *E. coli* en contact 30min avec des nanoparticules d'oxyde de cérium dans l'eau ultrapure.

- **Construction de l'isotherme d'adsorption**

Les isothermes d'adsorption permettent de caractériser les quantités adsorbées à l'équilibre par un système adsorbat-adsorbant. Lors de cette étude elles ont été utilisées afin de déterminer les capacités des bactéries à adsorber des nanoparticules d'oxyde de cérium. Les isothermes d'adsorption sont souvent établies expérimentalement par des méthodes gravimétriques, volumétriques ou chromatographiques. Ici, nous avons choisi d'utiliser l'électrophorèse capillaire pour établir ces isothermes.

Les cultures de bactéries (*Synechocystis* et *E. coli*) ont été mises en contact avec des nanoparticules de CeO_2 puis centrifugées afin de récolter les surnageants. L'analyse des surnageants a permis de calculer (grâce à la droite de la calibration) leur concentration en oxyde de cérium. La droite de calibration utilisée pour ces calculs a été établie à partir de l'analyse de solutions de nanoparticules de concentrations connues. De la concentration « libre » dans le surnageant, il est aisé d'en déduire, par soustraction, la concentration adsorbée par les cellules (en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Pour obtenir une concentration adsorbée par surface de cellules, les concentrations volumiques ont été divisées par la surface spécifique de chaque modèle biologique. Cette dernière a été estimée à partir de la concentration cellulaire (environ $2,7 \cdot 10^7$ cellules/mL pour *Synechocystis* et $5 \cdot 10^8$ cellules/mL pour *E. coli*) et de la surface estimée d'une cellule (10^{-11} m^2 pour *Synechocystis* assimilée à une sphère de rayon $1 \mu\text{m}$ et $2,4 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$ pour *E. coli* assimilée à un bâtonnet de longueur $1,5 \mu\text{m}$ et terminé à ses extrémités par des demi-sphères de diamètre $0,4 \mu\text{m}$). Les surfaces spécifiques des cultures de *Synechocystis* et *E. coli* sont donc respectivement $0,25$ et $1,2 \text{ m}^2 \cdot \text{L}^{-1}$.

- **Résultats et discussion pour *Synechocystis* et *E.coli***

Les isothermes d'adsorption obtenues pour *Synechocystis* et *E. coli* montrent des comportements différents (Figure 25).

E. coli atteint un plateau d'adsorption pour environ 12 mg de CeO_2 par m^2 de bactéries et les premiers points de l'isotherme d'adsorption ne présentent aucune trace de cérium dans les surnageants. Le taux de recouvrement surfacique peut être obtenu en multipliant cette valeur par la projection de la surface spécifique des nanoparticules sur la surface des bactéries. Lorsque les nanoparticules sont considérées dans leur intégralité, cette surface spécifique vaut $390 \text{ m}^2/\text{g}$. Si les nanoparticules sont assimilées à des sphères et que leur projection sur un plan est assimilée à un disque de rayon équivalent à celui de la nanoparticule (πr^2), la surface

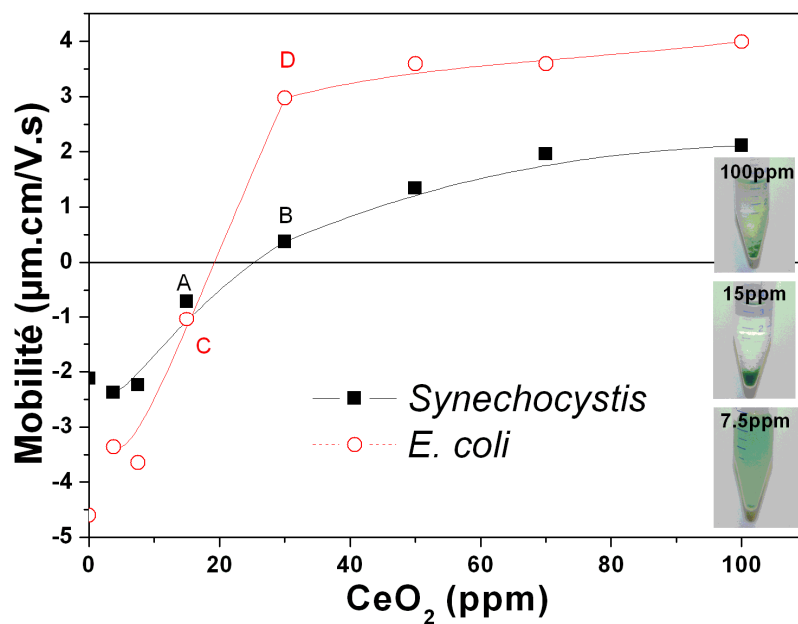


Figure 26 Evolutions des mobilités électrophorétiques de *Synechocystis* et *E. coli* dans l'eau en fonction de la concentration en CeO_2 .

spécifique en projection des nanoparticules est alors divisée par 4, d'où $100 \text{ m}^2/\text{g}$. Le taux de recouvrement des bactéries (*E. coli*) par les nanoparticules de CeO_2 est alors de $1,2 \text{ m}^2/\text{m}^2$ ce qui est proche d'une monocouche compacte. La valeur obtenue est légèrement supérieure à 1 car la surface d'une bactérie n'est pas lisse et comprend des replis ainsi que des pilis qui forment des surfaces d'adsorption supplémentaires non comptabilisées dans ce calcul.

En revanche, *Synechocystis* atteint un plateau vers 90 mg de CeO_2 par m^2 de bactéries ce qui représente une quantité 75 fois plus importante de nanoparticules par m^2 de surface cellulaire que pour *E. coli*. De plus, les premiers points de l'isotherme d'adsorption de *Synechocystis* montrent que des quantités non négligeables de cérium sont présentes en solution. En effet, le premier surnageant sans cérium en solution pour *Synechocystis* n'apparaît que pour des concentrations supérieures à 15 ppm de CeO_2 . De plus, les densités de recouvrement, obtenues comme décrit plus haut pour *E. coli*, sont comprises entre 7 et 9 m^2 de nanoparticules par m^2 de bactéries. Ces valeurs ne correspondent évidemment pas à une adsorption en monocouche compacte mais plutôt à une adsorption dans une couche étendue.

IV.2.1.2 Mobilité électrophorétique

La variation de mobilité électrophorétique des bactéries a également été mesurée en présence de nanoparticules. La mobilité électrophorétique permet de caractériser la charge électrique au voisinage d'un colloïde en fonction de son environnement. Elle est classiquement utilisée en physico-chimie pour déterminer la stabilité d'une suspension colloïdale, en effet, plus la mobilité est éloignée (en valeur absolue) de zéro, plus la charge des colloïdes est importante et favorise les forces électrostatiques de répulsion et donc la stabilité de la suspension.

Les échantillons ont été préparés par ajout de suspension de nanoparticules à des suspensions cellulaires d'*E. coli* et *Synechocystis* préalablement lavées dans l'eau ultrapure (voir matériels et méthode). La Figure 26 montre l'évolution de la mobilité électrophorétique de cellules de *Synechocystis* et *E. coli* resuspendues dans l'eau ultrapure en fonction de la concentration en nanoparticules de CeO_2 ajoutées ensuite. La mobilité électrophorétique des échantillons montre une tendance globale similaire pour *Synechocystis* et *E. coli*. Les cellules ont une charge de surface négative lorsqu'elles sont dans l'eau (et dans leur milieu de culture). L'ajout de nanoparticules de CeO_2

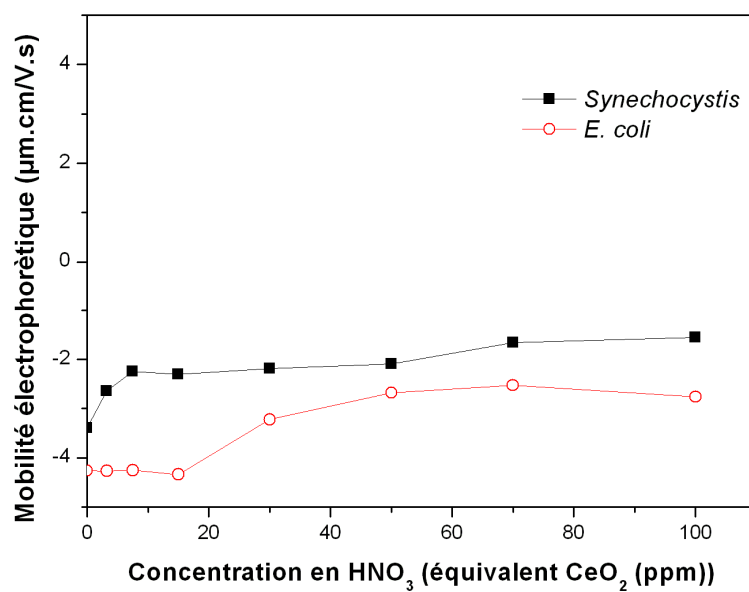


Figure 27 Evolutions de la mobilité électrophorétique de *Synechocystis* et *E. coli* dans l'eau en fonction de la concentration en acide nitrique rapportée à son équivalent en concentration de CeO₂.

chargées positivement provoque une augmentation progressive de la mobilité électrophorétique des cellules, jusqu'à l'obtention de la neutralité. Celle-ci est atteinte entre 15 et 30 ppm de CeO₂, concentrations correspondant aux points A et B pour *Synechocystis* et aux points C et D pour *E. coli*. L'ajout supplémentaire de nanoparticules induit un changement de signe de la mobilité électrophorétique des cellules.

A partir des points A et C (15 ppm), les cultures sont floculées. Jusqu'à 30 ppm, les cultures forment des floccs macroscopiques qui décantent rapidement. Pour les concentrations supérieures, les cultures floculent également mais les floccs restent en suspension (voir Photo 9, p.146). Cette stabilité s'explique à présent par l'existence d'une mobilité électrophorétique positive permettant les répulsions électrostatiques entre bactéries recouvertes de nanoparticules. Cependant, les évolutions de la mobilité électrophorétique d'*E. coli* et de *Synechocystis* ne sont pas identiques. En effet, si l'ajout de nanoparticules entraîne un brusque changement de signe de la mobilité électrophorétique chez *E. coli*, il n'en est pas de même pour *Synechocystis*. La mobilité électrophorétique de cette dernière évolue de façon beaucoup plus progressive que pour *E. coli* et atteint moins nettement un plateau (ce qui confirmerait une adsorption sur une couche diffuse).

La mobilité électrophorétique étant dépendante du pH de la solution utilisée, les échantillons ont également été reproduits avec une quantité d'acide nitrique équivalente à celle apportée par les nanoparticules (mais sans les nanoparticules). La Figure 27 montre qu'une simple variation de pH entraîne une augmentation de la mobilité électrophorétique d'environ 1,5 $\mu\text{m.cm/Vs}$ mais pas de changement de signe. Ce dernier résulte donc bien de l'adsorption des nanoparticules, suite à leur addition, sur les cellules et non du pH des suspensions de NPs.

IV.2.1.3 Discussion sur les différents modèles d'adsorption

Pour les deux modèles bactériens, le changement de signe de la mobilité électrophorétique permet d'expliquer la zone de forte floculation macroscopique déclenchée par l'addition de 15 et 30 ppm de CeO₂. Cependant, les isothermes d'adsorption et la mesure de la mobilité électrophorétique montrent des comportements différents chez *Synechocystis* et *E. coli*.

L'isotherme d'adsorption des nanoparticules sur *E. coli* suggère la présence d'une monocouche de nanoparticules à la surface des cellules. Cette hypothèse peut être confirmée par l'évolution de la mobilité électrophorétique. Le changement de signe rapide et la présence d'un plateau

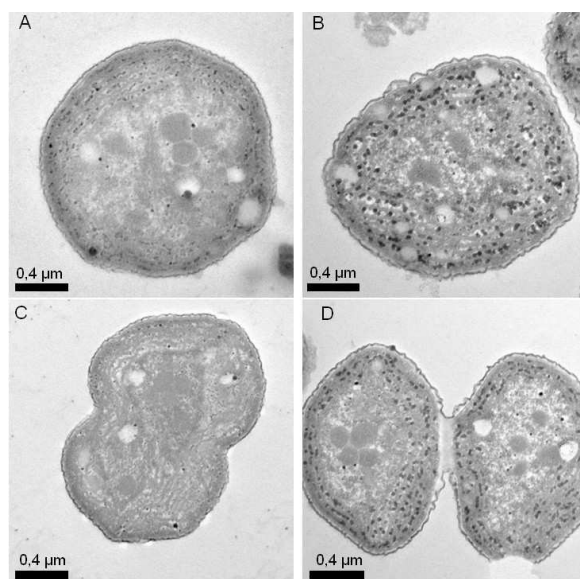


Photo 13 Différentes vues d'un échantillon de *Synechocystis* observé en MET après 3h dans l'eau ultrapure.

A et B : cellules individualisées, C et D : cellules en cours de division.

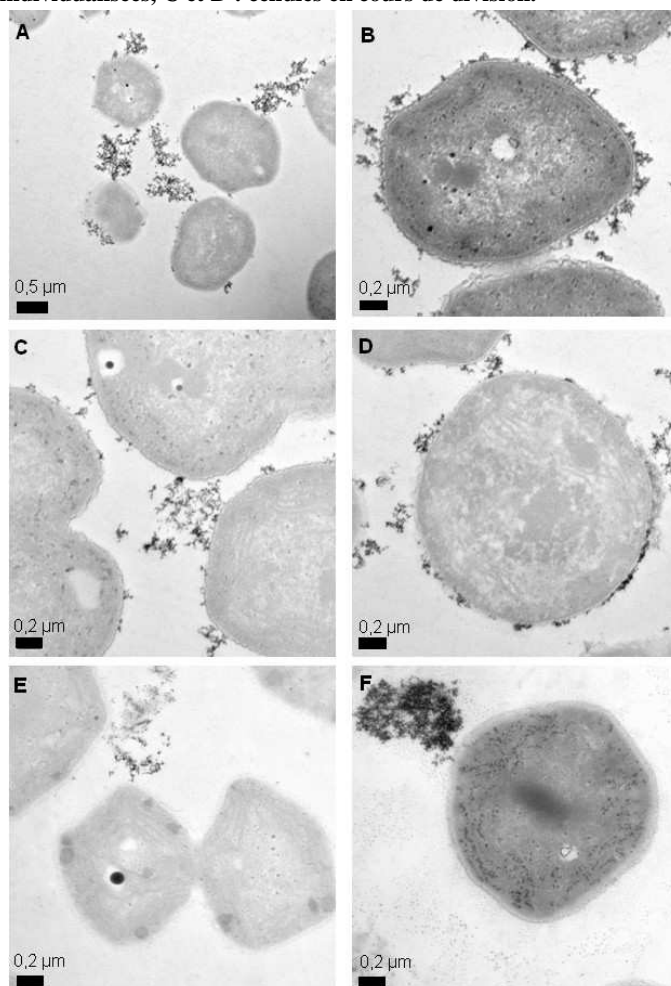


Photo 14 Différents échantillons observés en MET avec des colorations différentes de *Synechocystis* en contact avec 240 ppm de CeO_2 nanoparticulaires pendant 3h dans l'eau ultrapure.

sont caractéristiques d'une adsorption en couche fine sur une surface lisse. Les nanoparticules de CeO_2 , chargées positivement, sont attirées par les charges négatives présentes à la surface d'*E.coli* et viennent s'y adsorber en monocouche.

Le cas de *Synechocystis* est plus complexe puisque l'adsorption est bien supérieure à la monocouche. Pourtant la mobilité électrophorétique de *Synechocystis* (entre -30 et -40 mV) dans l'eau est supérieure à celle d'*E. coli* (-60 mV). L'adsorption des nanoparticules sur *Synechocystis* devrait donc être plus limitée que sur *E. coli* s'il s'agissait d'une compensation de charge sur une surface lisse. De plus, la mobilité électrophorétique continue d'augmenter en fonction de la concentration en nanoparticules après avoir atteint un pseudo plateau. Ce comportement est caractéristique d'une adsorption en une couche plus épaisse que la longueur caractéristique de Debye (voir chapitre III et annexe).

IV.2.2 Localisation à l'échelle de la cellule

Les mesures d'isotherme d'adsorption et de la mobilité électrophorétique ont permis de conclure à une interaction forte des NPs de CeO_2 avec les deux modèles biologiques. Ces mesures, de nature macroscopique, conduisent à s'interroger sur la morphologie des couches adsorbées. Les techniques de microscopie électronique vont nous permettre de les observer.

IV.2.2.1 Microscopie électronique en transmission

Plusieurs types de systèmes ont été tout d'abord examinés en microscopie électronique en transmission (MET). La préparation des échantillons et des coupes est décrite dans la partie « matériels et méthodes IV.4 .3 ».

- ***Synechocystis* dans l'eau ultrapure, incubation avec des nanoparticules**

Les premières observations ont été réalisées sur des échantillons témoins sans nanoparticules. La structure interne et la membrane des cellules (Photo 13 , échantillons réalisés au laboratoire) apparaissent avec plus ou moins de détails en fonction du colorant et du temps de contact utilisés pour la coloration.

Après une mise en contact de 3h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau, les photographies MET (Photo 14) de *Synechocystis* montrent que les nanoparticules (points noirs, denses aux électrons) forment généralement de gros agrégats à proximité des cellules

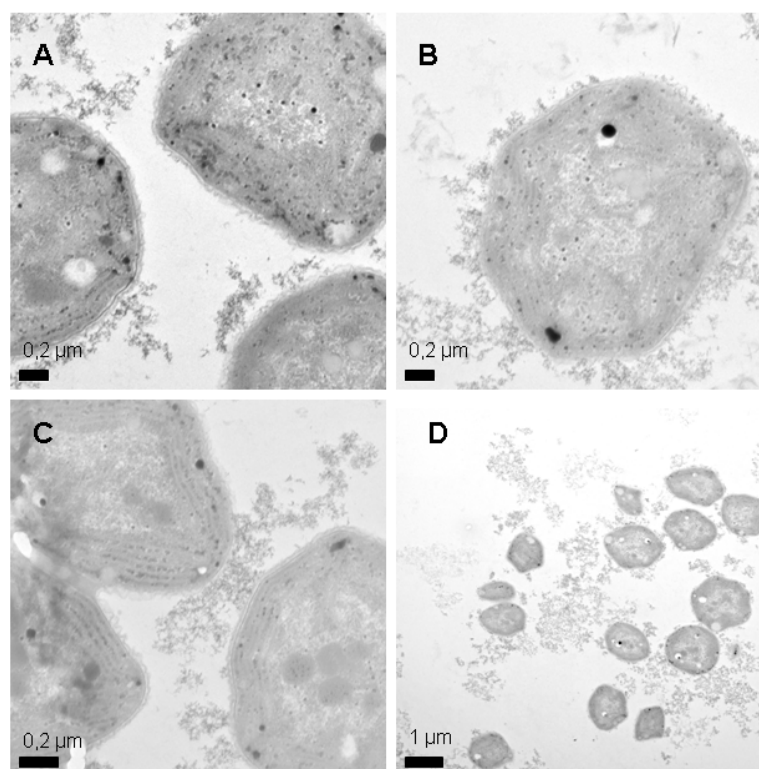


Photo 15 Différentes vues observées en MET d'un échantillon de *Synechocystis* en contact avec 240 ppm de CeO_2 nanoparticulaires pendant 3h dans le MM.

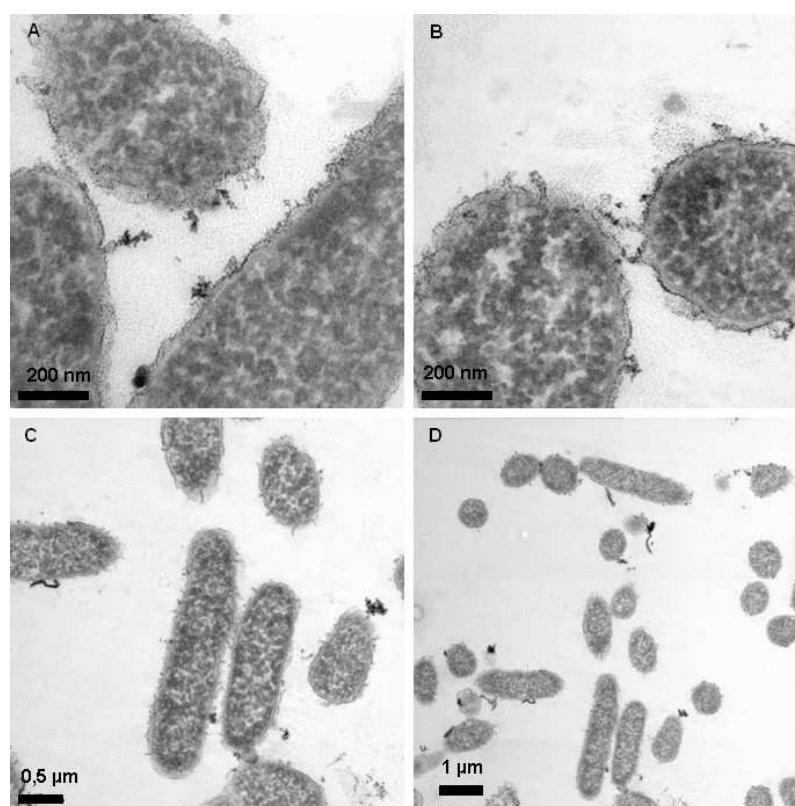


Photo 16 Différents vues d'un échantillon observé en MET de *E. coli* ayant incubées 3h dans l'eau ultrapure avec 240 ppm de CeO_2 nanoparticulaires.

(photos A, E et F). Quelques cellules sont recouvertes de nanoparticules (photos B, C et D), mais de manière non uniforme. Ainsi, la majorité des observations montrent un contact direct limité des nanoparticules avec la paroi extérieure de *Synechocystis*. En revanche, de nombreux agrégats de nanoparticules sont visibles à proximité des cellules.

- ***Synechocystis* dans le MM avec NPs**

Les observations réalisées sur une culture de *Synechocystis* mise en contact 3h avec des nanoparticules de CeO₂ dans le milieu de culture MM (Photo 15) montrent également une répartition inhomogène des nanoparticules à la surface des cellules. La structure des agrégats de nanoparticules est cependant légèrement différente (moins compacte) que dans le cas où le milieu était remplacé par l'eau ultrapure. Il est possible que ces structures soient des agrégats de nanoparticules dus à la présence de sels dans le milieu de culture.

- ***E. coli* dans l'eau ultrapure avec NPs**

A contrario, dans le cas d'*E. coli* en contact pendant 3h dans l'eau avec des nanoparticules de CeO₂ (Photo 16) très peu d'agrégats intercellulaires sont présents. Sur les photos A et B il est possible de distinguer des nanoparticules formant une couche uniforme le long de la paroi des bactéries. Cependant la matrice en arrière plan apparaît également sous forme de grains noirs et perturbe légèrement les observations.

IV.2.2.2 Cartographie XEDS

La microscopie électronique en transmission possède l'avantage de permettre une visualisation directe des nanoparticules, et c'est ce qui en fait son grand attrait. Cependant, ces techniques d'imagerie directe étant réalisées sur des couches minces d'échantillons secs, elles ne permettent pas d'obtenir d'informations sur le comportement physicochimique des colloïdes en solution. De plus, les images obtenues sont souvent sujettes à des artefacts liés aux protocoles de préparation des échantillons. Il est aussi parfois difficile de discerner des nanoparticules lorsqu'elles sont de l'ordre de 10 nanomètre, comme dans cette étude, de précipités dus aux colorants et notamment au citrate de plomb. Il est également difficile de conclure quant à la possible pénétration des nanoparticules à l'intérieur de la cellule bactérienne. L'analyse cartographique élémentaire (XEDS) permet de pallier à la plupart de ces problèmes.

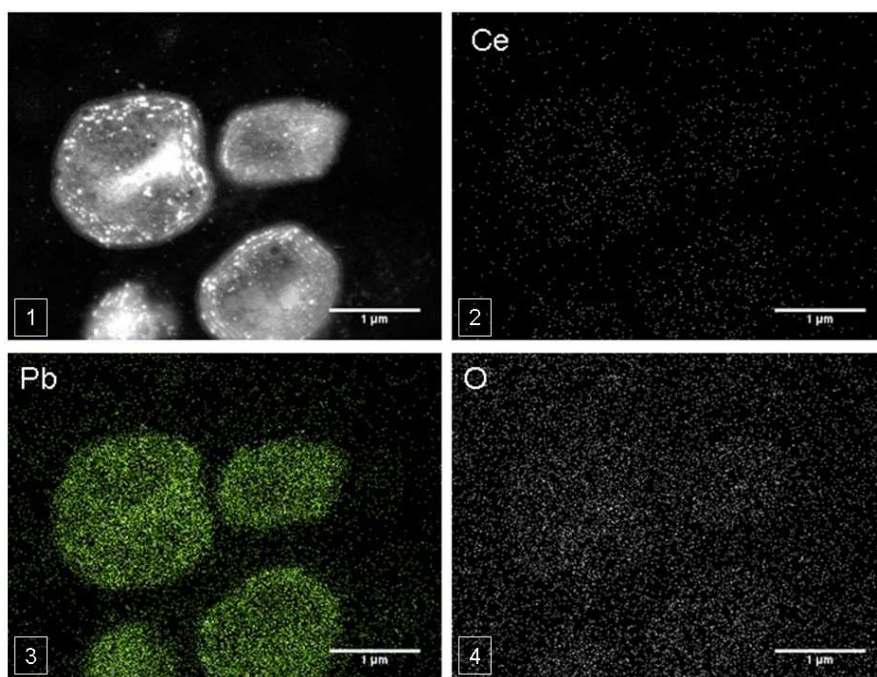


Photo 17 Observations HAADF et cartographie EDS de *Synechocystis* en contact 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 .

1 : image STEM/HAADF de quatre cellules, 2 : cartographie au seuil $L\alpha$ du cérium, 3 : cartographie au seuil du plomb et 4 : cartographie au seuil de l'oxygène. Barre d'échelle : 1 μm .

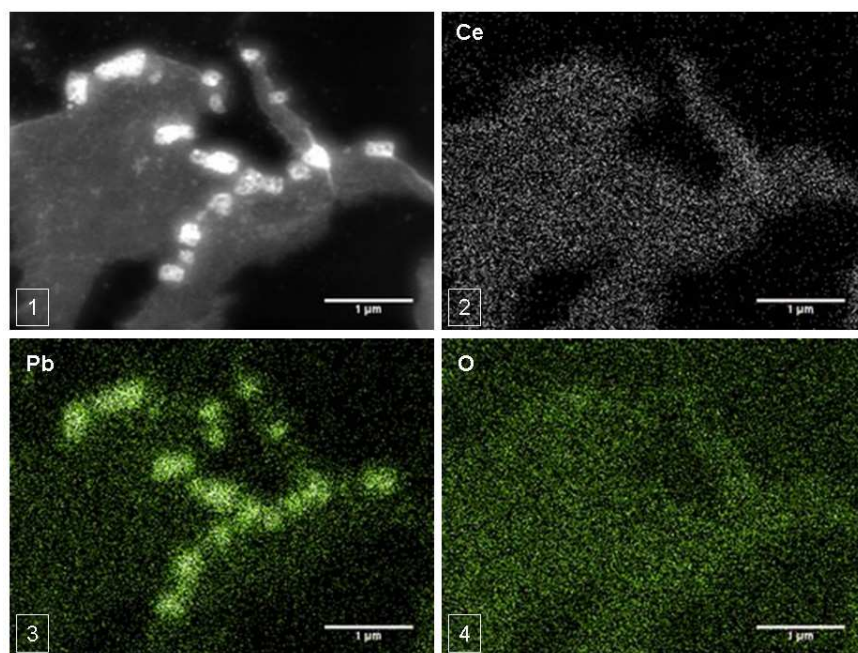


Photo 18 Observations HAADF et cartographie EDS d'un agrégat présent dans l'échantillon *Synechocystis* en contact 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 .

1 : image STEM/HAADF, 2 : cartographie au seuil $L\alpha$ du cérium, 3 : cartographie au seuil du plomb et 4 : cartographie au seuil de l'oxygène. Barre d'échelle : 1 μm .

- ***Synechocystis* dans l'eau ultrapure avec NPs**

L'échantillon de *Synechocystis* en contact 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO₂ a été observé en microscopie électronique en transmission à balayage couplée aux techniques en champ noir annulaire à grand angle (STEM/HAADF High Angle Annular Dark Field) et à la cartographie XEDS (Photo 17).

Les images obtenues par la technique d'imagerie HAADF (Photo 17-1) donnent des informations sur la composition des échantillons. Les régions apparaissant avec un contraste plus clair (points blancs) indiquent la présence d'éléments lourds. Dans notre étude, les nanoparticules de cérium sont des éléments lourds facilement mis en évidence par ce type de technique. Dans l'échantillon présenté Photo 17-1, l'image HAADF montre la présence de régions plus denses à l'intérieur des cyanobactéries *Synechocystis*. Cependant, ces éléments lourds ne sont pas du cérium car il n'y a aucune trace de cérium dans ni autour des cellules (cartographie XEDS Photo 17-2). Des analyses plus locales à l'intérieur des cellules confirment ce résultat. Les points plus clairs sont donc probablement les complexes protéiques plus denses (phycobilisomes) déjà identifiés en MET (Photo 13, p. 160). La cartographie au seuil du plomb (Photo 17-3) confirme la présence de plomb dans l'échantillon provenant de l'étape de coloration. Des agrégats (Photo 18) trouvés dans la coupe à distance des cellules ont également été analysés en cartographie XEDS et sont principalement composés de cérium (Photo 18-2). Absentes d'un contact direct avec les cellules, les nanoparticules semblent être principalement localisées dans des agrégats.

- ***Synechocystis* dans le MM avec NPs**

La Photo 19 présente une coupe de deux cellules de *Synechocystis* mises en contact 3h dans le MM avec des nanoparticules de CeO₂. L'imagerie STEM/HAADF met en évidence la présence de structures très denses agrégées à proximité immédiate des cellules (structures déjà repérées en MET). La cartographie confirme que ces agrégats ne sont pas uniquement composés de sels mais en grande partie de cérium (Photo 19-2). Les photos Os et U présentent également respectivement la cartographie de l'osmium et de l'uranium, deux éléments présents dans les réactifs utilisés lors de la fixation et la coloration de la coupe.

De plus, les analyses XEDS effectuées localement à l'intérieur des bactéries ne révèlent aucune trace de cérium.

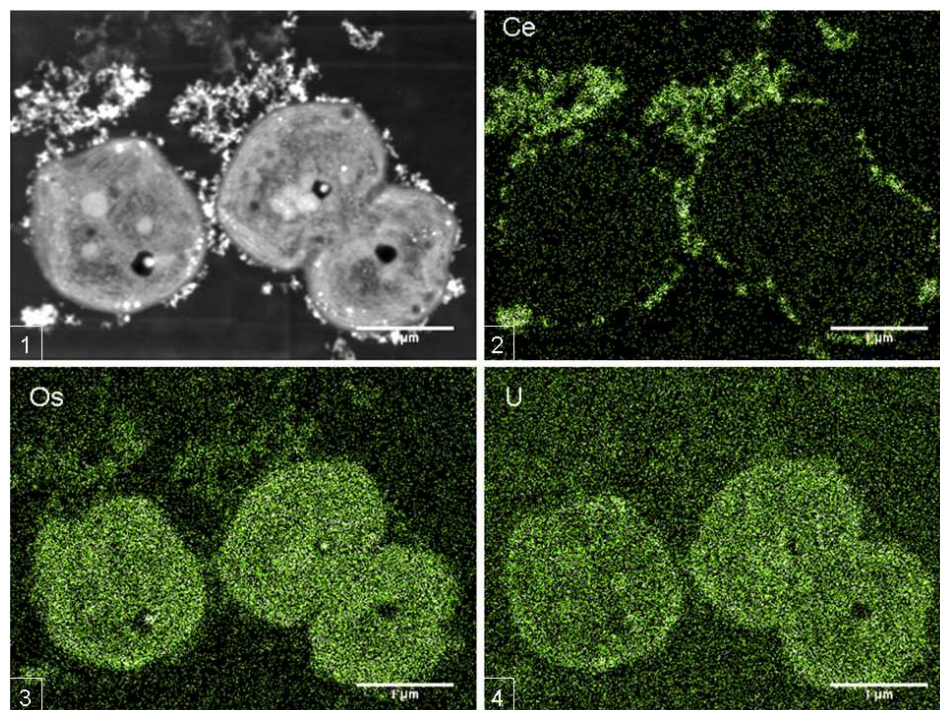


Photo 19 Observations HAADF et EDS de *Synechocystis* en contact 3h dans le MM avec des nanoparticules de CeO₂.

1 : image STEM/HAADF de deux cellules, 2 : cartographie au seuil La du cérium, 3 : cartographie au seuil de l'osmium et 4 : cartographie au seuil de l'uranium. Barre d'échelle : 1 μm .

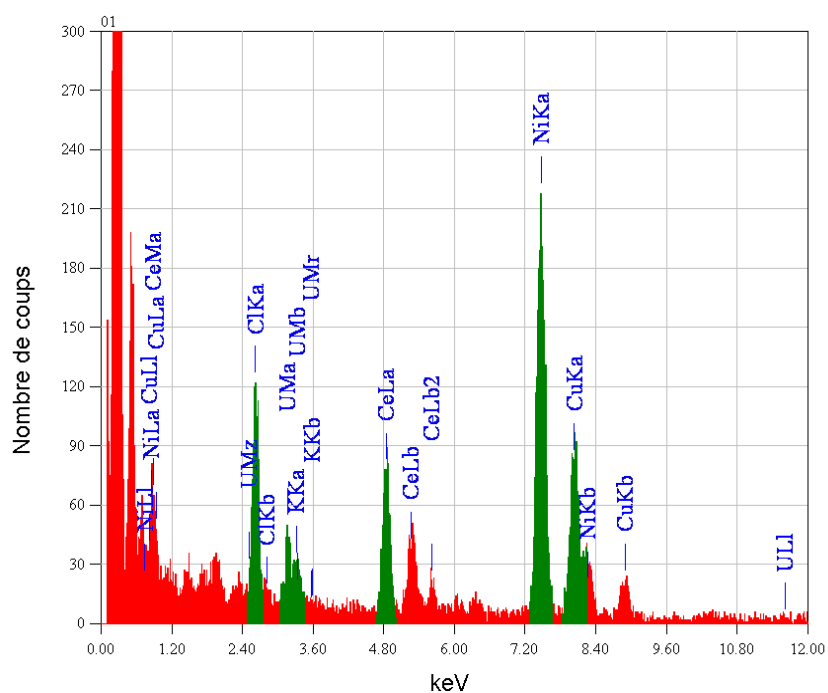


Figure 28 Analyse XEDS localisée sur un agrégat à proximité d'une bactérie dans l'échantillon : *Synechocystis* en contact avec des nanoparticules de CeO₂ dans le MM pendant 3h.

En revanche l'analyse EDS locale des agrégats met en évidence une composition riche en cérium (Figure 28) avec la présence des pics d'énergie qui lui sont associés entre 4,80 et 6 keV ($\text{CeL}\alpha$, $\text{CeL}\beta$ et $\text{CeL}\beta_2$). L'analyse XEDS révèle également d'autres éléments présents en grande quantité dans l'échantillon (Cl, K, U) ou dans les constituants de la grille servant de support échantillon (Ni, Cu).

- ***E.coli* dans l'eau ultrapure avec NPs**

Une culture d'*E. coli* soumise à un contact de 3h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure a également été examinée en STEM/HAADF et cartographie XEDS (Photo 20). Ces observations conduisent à des conclusions moins ambiguës que celles déduites du MET. En effet, les parois des bactéries apparaissent clairement encerclées d'éléments denses (lignes brillantes) et la cartographie EDS confirme que ces éléments contiennent une forte densité de cérium (Photo 20-2). La cartographie au seuil de l'osmium (Photo 20-3) met de nouveau en évidence l'accumulation de cet élément, utilisé lors de la coloration des échantillons, dans les cellules. Les nanoparticules de cérium sont observées sur toutes les surfaces disponibles dans la culture : la paroi des bactéries, les pilis et des fragments cellulaires.

Afin de vérifier si le cérium présent est toujours sous forme nanoparticulaire, nous avons effectué des agrandissements d'une zone (rectangle Photo 21 A) où deux parois de bactéries sont en contact direct. La photo B montre que la région claire autour des bactéries est bien constituée de nanoparticules individualisées d'oxyde de cérium (environ 5 nm). Les photos C (haute résolution) et D (image de diffraction) prouvent que ces nanoparticules sont cristallisées puisque les anneaux de diffraction correspondent à ceux de l'oxyde de cérium. Sur l'image B, la projection en deux dimensions de la coupe en trois dimensions (90 nm d'épaisseur) donne une fausse impression de multicouches adsorbées. Les expériences d'isothermes d'adsorption et de mobilité électrophorétique ainsi que la répartition spatiale homogène des nanoparticules confirment néanmoins, que les nanoparticules sont adsorbées en monocouche.

En résumé, les observations MET et cartographies d'analyses EDS ont permis de mettre en évidence :

- la présence d'une couche uniforme et individualisée de nanoparticules sur l'enveloppe cellulaire des cellules d'*E. coli*,

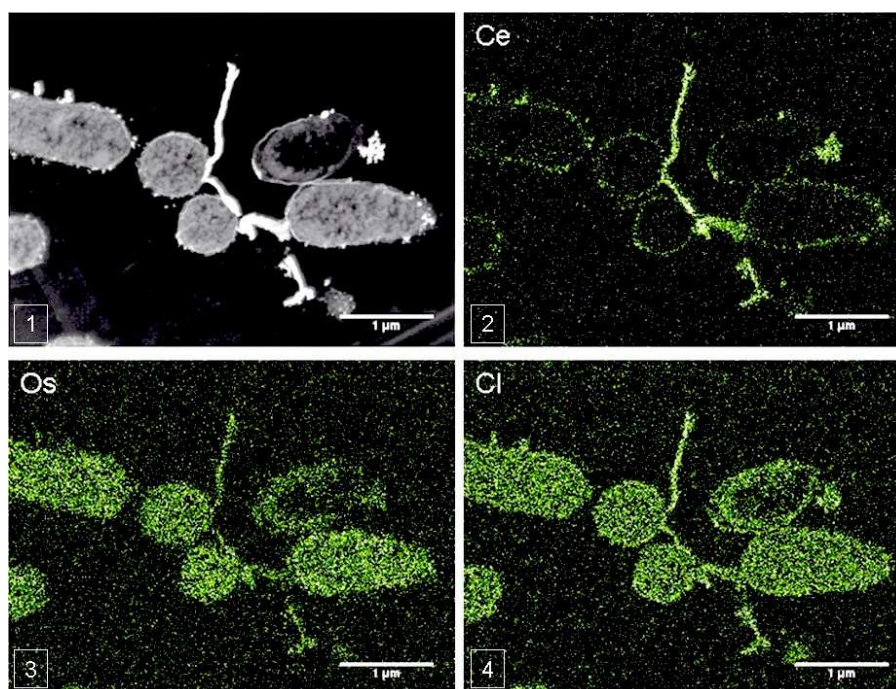


Photo 20 Observations HAADF et EDS de *E. coli* en contact 3h dans l'eau avec des NPs de CeO_2 . 1 : image STEM/HAADF, 2 : cartographie au seuil $L\alpha$ du cérium, 3 : cartographie au seuil de l'osmium et 4 : cartographie au seuil du chlore. Barre d'échelle : 1 μm .

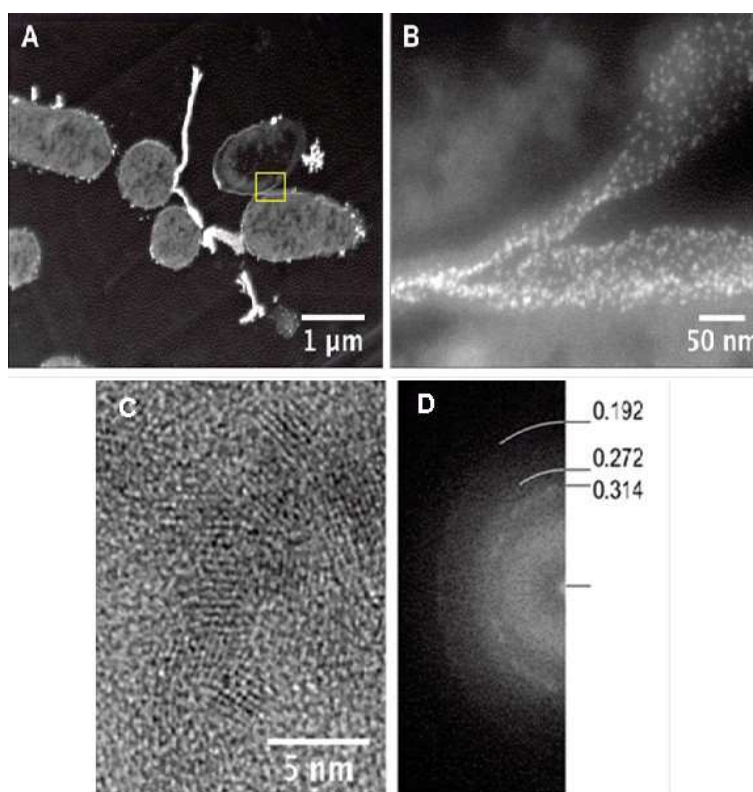


Photo 21 Détails de l'échantillon : *E. coli* en contact avec des NPs de CeO_2 pendant 3h dans l'eau. A : Image STEM/HAADF; B : agrandissement de la zone définie par le rectangle sur la photo A ; C : agrandissement à ultrahaute résolution de nanoparticules de la zone B ; D : image en diffraction des nanoparticules.

- la présence d'agrégats très irréguliers contenant de grande quantité de nanoparticules à proximité plus ou moins immédiate des cellules de *Synechocystis* et
- la non-pénétration du cérium (sous forme nanoparticulaire ou ionique) à l'intérieur des cellules et ce quelque soit le modèle bactérien.

Ces observations ont donc confirmé les hypothèses émises à partir des mesures de la mobilité électrophorétique et l'établissement de l'isotherme d'adsorption sur l'existence de deux modèles d'adsorption des nanoparticules différents sur les cellules de *Synechocystis* d'une part et d'*E. coli* d'autre part. Cependant ces données n'expliquent pas la rareté de la présence des nanoparticules à la surface de *Synechocystis* et sont même en contradiction avec la forte adsorption des NPs sur les cellules ainsi qu'avec l'inversion de la charge de leur potentiel de surface. En effet, *Synechocystis*, comme *E. coli*, possède une charge de surface négative qui devrait attirer les nanoparticules chargées positivement.

La structure des agrégats observés dans le cas de *Synechocystis* en contact avec des nanoparticules de CeO₂ dans le MM évoque cependant une adsorption de nanoparticules sur des structures polymériques. En effet, la souche de *Synechocystis* utilisée comme modèle dans cette étude synthétise des substances polymériques extracellulaires (Panoff, 1989). Celles-ci, composées en majorité d'exopolysaccharides (EPS), forment un gel hydraté autour des cellules (Phoenix *et al.*, 2002). Ces EPS, présents chez *Synechocystis* et absents chez *E. coli*, pourraient être à l'origine de l'agrégation des nanoparticules dans les cultures de *Synechocystis*. C'est ce qui va être étudié dans la section qui suit.

IV.2.3 Influence des exopolysaccharides (EPS) de *Synechocystis*

IV.2.3.1 Définition et rôle des EPS microbiens

Les polysaccharides sont des polymères composés en majeure partie de glucides. Les sources de production des polysaccharides peuvent être variées : végétales (galactomannanes, pectines), algales (alginates, agar, carraghénanes), mais aussi bactériennes (xanthane) (Panoff, 1989). Les polysaccharides sont utilisés dans l'industrie chimique et agroalimentaire pour leurs propriétés gélifiantes et rhéofluidifiantes (diminution de la viscosité par augmentation de

la vitesse de cisaillement). Ils ont également des applications potentielles en pharmacologie, en effet, ils peuvent servir dans la fabrication d'os artificiels, avoir des propriétés anticoagulantes et stimuler le système immunitaire (Collic-Jouault *et al.*, 2004).

Chez les bactéries et cyanobactéries, les polysaccharides sont présents au niveau de la paroi cellulaire (les lipopolysaccharides, LPS), à l'extérieur de la cellule mais liés à cette même cellule (polysaccharide capsulaire) soit encore libres dans le milieu de culture sous forme d'exopolysaccharides (EPS) (Venzke, 2005). Les polysaccharides capsulaires et exopolysaccharides se distinguent par leur degré de labilité notamment face à une force centrifuge. La production des EPS cyanobactériens a été mise en évidence dès les années 1880 (Drews and Weckesser, 1982). Les types d'EPS synthétisés et leur taux de production peuvent varier suivant l'état physiologique des cellules (croissance active = phase exponentielle de croissance, ralentie ou stoppée = phase stationnaire) déterminé par les conditions expérimentales (ex : un excès de carbone par rapport à l'azote disponible semble favoriser la production d'EPS). Les EPS se distinguent des autres types de polysaccharides de l'enveloppe cellulaire car ils ne possèdent pas de modèle général simple. Ils se différencient par la nature variée des monosaccharides, des substitutions et des types de liaisons qui les constituent. Ils peuvent cependant être généralement classés en deux grandes catégories, les homopolysaccharides (constitués d'unités saccharides identiques) et les hétéropolysaccharides (constitués d'unités saccharides variées). Les unités monosaccharidiques sont liées entre elles par des liaisons glycosidiques (Panoff, 1989).

Le monosaccharide majoritairement présent chez les polysaccharides des cyanobactéries est le glucose, mais l'acide uronique, le xylose, l'arabinose, le fucose, le rhamnose et le mannose peuvent également être présents en quantité importante. Les polysaccharides peuvent être acides ou neutres s'il y a présence (ou non) d'acides uroniques ou de pyruvates (Venzke, 2005). Une caractéristique particulière des exopolysaccharides de certaines cyanobactéries, telles que *Synechocystis*, est la présence de groupement sulfates (Jürgens *et al.*, 1983, Panoff, 1989, Panoff *et al.*, 1988 et Panoff and Joset, 1989).

La localisation de ces polysaccharides à la surface cellulaire en fait d'excellents agents d'adaptation aux contraintes du milieu environnant. Ils favorisent par exemple la protection contre la dessiccation ou les virus, la rétention de nutriments solubles ou la fixation à des

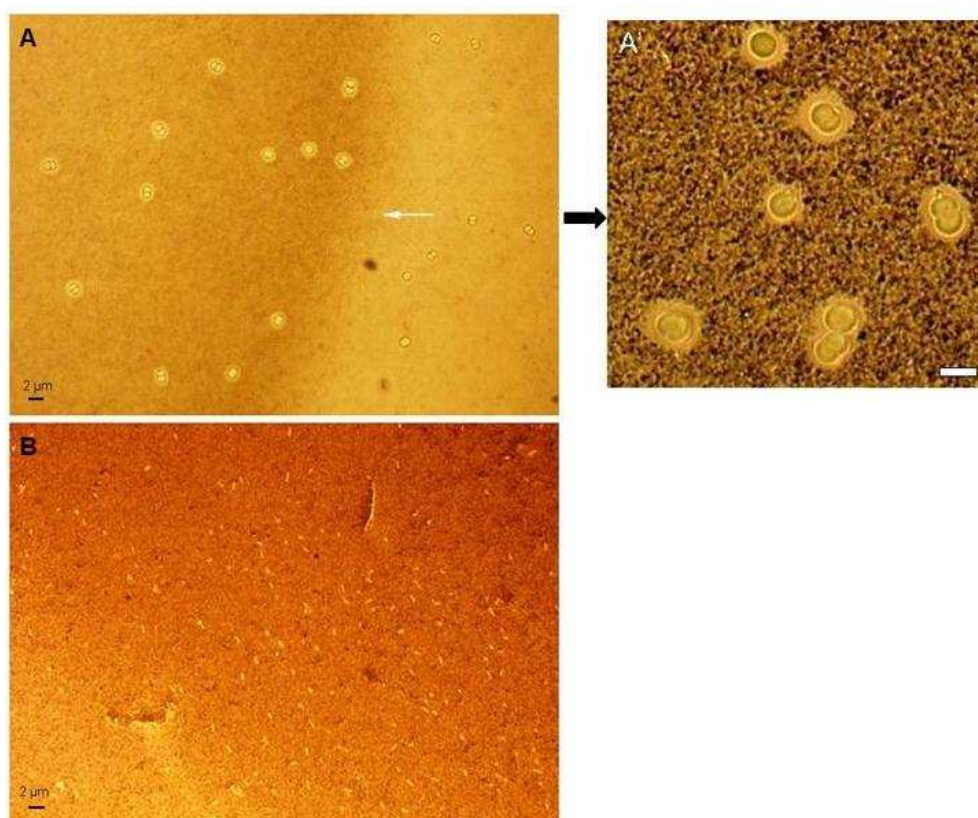


Photo 22 Mise en évidence en microscopie optique de la présence ou non d'EPS dans des cultures de cellules lavées dans l'eau ultrapure grâce à l'encre de Chine.

A : culture de *Synechocystis* en phase exponentielle. La flèche blanche indique le front d'encre de Chine.
A' : agrandissement de A. **B :** culture d'*E. coli* en phase stationnaire.

supports spécifiques (biofilms) (Leroy, 2006). Les EPS peuvent également avoir un rôle important dans le caractère pathogène de certaines bactéries.

IV.2.3.2 Visualisation des EPS en microscopie optique

Synechocystis PCC6803 est capable de former un biofilm lorsqu'elle se trouve en phase stationnaire (Panoff, 1989). En général, les études (génétiques, physiologiques, ...) réalisées sur cette cyanobactérie utilisent des cultures en phase exponentielle, ce qui est le cas lors de notre étude. Cependant, les cyanobactéries qui synthétisent des exopolysaccharides pendant leur phase stationnaire de développement, n'en synthétisent pas systématiquement en phase exponentielle. Si malgré tout, tel est le cas, les quantités d'EPS produites étant faibles, une simple observation des cultures (en liquide ou solide) ne permet pas de certifier leur présence. De plus, les polysaccharides étant des structures à 90% hydratées, ils sont invisibles :

- en microscopie optique, car ils possèdent le même indice de réfraction que le milieu et
- en microscopie électronique, car ils sont facilement labiles et non denses aux électrons.

L'observation directe des EPS n'est donc pas toujours évidente.

- **Visualisation par l'encre de Chine**

Il existe cependant une méthode assez simple de microscopie optique qui permet de visualiser la présence d'EPS autour des cellules. Cette technique consiste à piéger une goutte de la culture cellulaire entre lame et lamelle, et d'ajouter à un coin de la lamelle, une goutte d'encre de Chine. La composition exacte de l'encre de Chine n'est pas toujours précisée par le fabricant, elle est cependant majoritairement constituée de noir de carbone stabilisé par une gomme (gélatine). Elle forme donc une suspension stable de colloïdes chargés négativement. Lorsque l'encre de Chine diffuse sous la lamelle, les interactions entre colloïdes de l'encre de Chine et cellules sont révélatrices de la présence ou non d'EPS.

La Photo 22 montre deux suspensions cellulaires : *Synechocystis* (A) et *E. coli* (B), dans l'eau ultrapure en présence d'encre de Chine. Sur la photo A, le front vertical d'encre de Chine est indiqué par une flèche blanche. A gauche de cette limite, les cellules sont entourées par

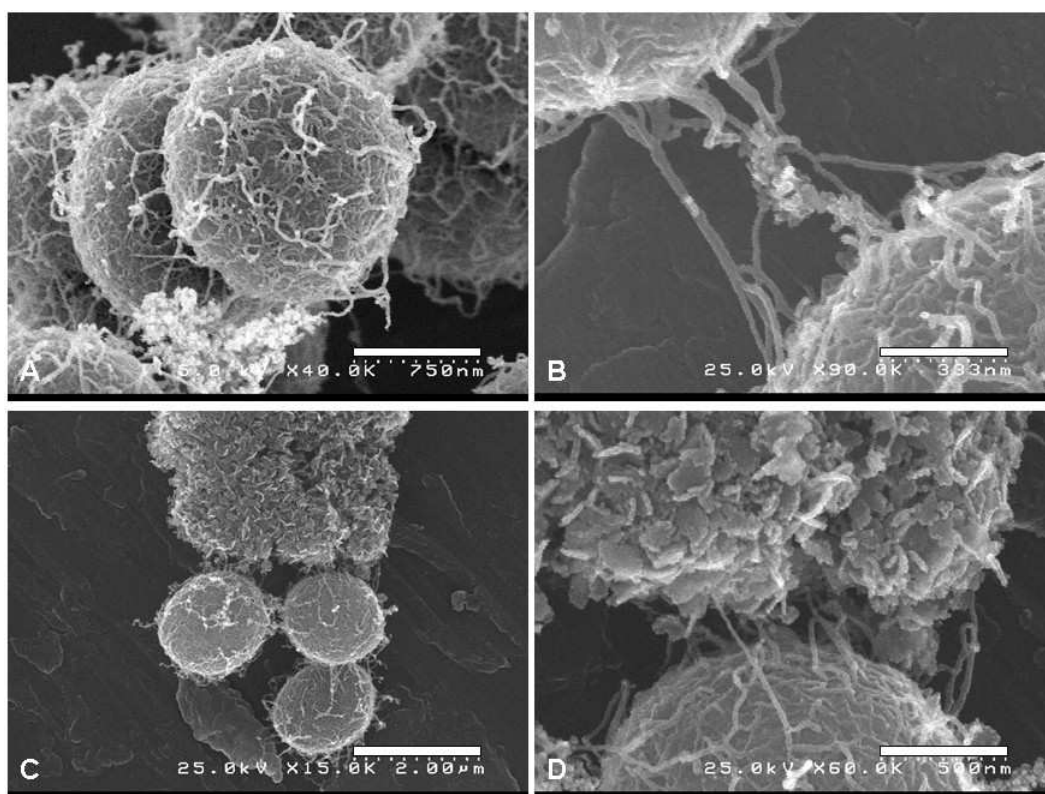


Photo 23 Images de *Synechocystis* observées en MEB après fixation (glutaraldéhyde et bleu alcian), déshydratation dans l'éthanol et séchage au CO₂ supercritique.

l'encre de Chine, qui n'est pas encore présente dans la partie droite. La couronne plus claire observée autour des cellules de *Synechocystis* dans la partie gauche de la photo A est caractéristique de la présence d'exopolysaccharides qui empêchent les colloïdes de l'encre de Chine de venir au contact des cellules. Cette répulsion peut être stérique, les EPS se comportant comme un filet aux mailles plus petites que le diamètre des colloïdes, et/ou électrostatique car les EPS sont majoritairement chargés négativement comme les colloïdes de l'encre de Chine. De plus, les cellules qui ne sont pas en contact avec l'encre de Chine (partie droite de la photo) ne présentent pas cette couronne transparente. Ceci confirme donc que cette dernière n'est pas le résultat d'une mise au point particulière lors de l'observation en microscopie. En revanche, sur la photo B, les bactéries d'*E. coli* ne sont pas entourées de cette couronne plus claire. Cette expérience constitue donc un premier indice de la présence d'une couche polymérique autour de *Synechocystis* et son absence chez *E. coli*.

- **Visualisation des EPS en microscopie électronique à balayage (MEB)**

La microscopie électronique à balayage, couplée à un séchage supercritique et une coloration au bleu Alcian, a été utilisée afin de visualiser plus en détails les réseaux d'exopolysaccharides (protocole décrit par Erlandsen *et al.*, 2004).

La Photo 23 présente des images MEB de *Synechocystis* ayant subi une déshydratation dans l'éthanol après l'étape de fixation. Les photographies A et B soulignent la présence de structures polymériques à la surface des cellules. Ces structures fragiles ont été préservées grâce à la fixation au bleu Alcian et à l'étape de séchage au CO₂ supercritique. Les structures observées sont liées à la surface des cellules (photo B), il s'agit donc de pilis et non pas d'EPS. En quelques rares endroits, l'échantillon contient toutefois des objets ressemblant à des cellules recouvertes d'une structure compacte (photo C). Seuls les pilis sortant de cette structure nous autorisent à supposer l'existence de bactéries sous cette couche informe (agrandissement photo D). Les études menées sur l'analyse des EPS sont en général précédées d'une étape de précipitation dans l'éthanol pour extraire les EPS. Il était donc logique que les étapes classiques de déshydratation dans l'alcool (en général essentielles pour la bonne tenue de l'échantillon sous vide) pouvaient être à l'origine de l'absence d'EPS lors des observations en microscopie électronique (MET et MEB), et ce malgré la présence de fixateurs tels que le glutaraldéhyde et le bleu Alcian sensés protéger les EPS contre ces étapes de déshydratation-lavages.

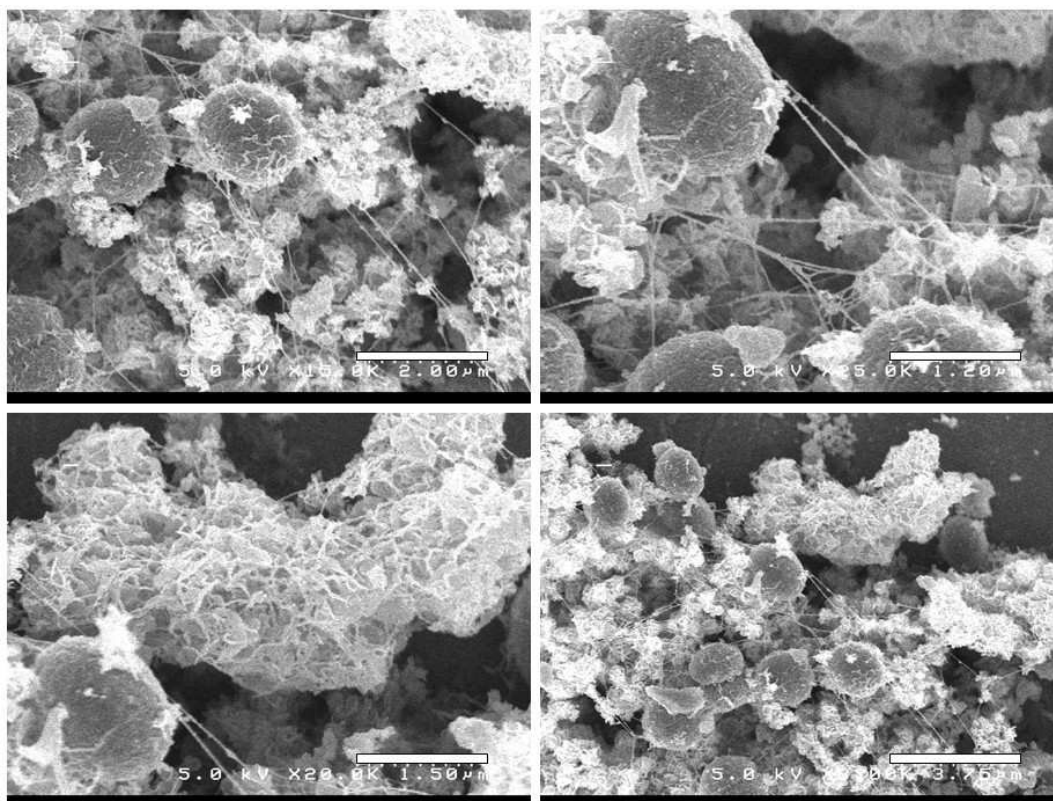


Photo 24 Images de *Synechocystis* observées en MEB après fixation (glutaraldéhyde et bleu alcian), suivie par un séchage direct au CO₂ supercritique.

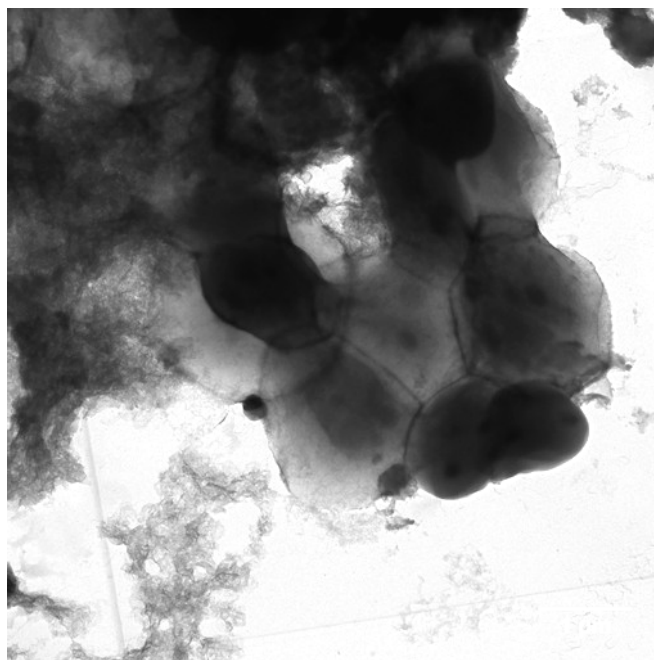


Photo 25 Observation MET d'un groupe de bactéries *Synechocystis* en contact avec des nanoparticules de CeO₂ pendant 3h dans l'eau.

Fixation au glutaraldéhyde et bleu Alcian, sans étapes de déshydratation dans l'éthanol, dépôt d'échantillon sous forme liquide sur grille.

Les échantillons ont donc été reproduits dans les mêmes conditions mais sans les étapes de déshydratation dans l'éthanol (Photo 24). L'observation de cellules de *Synechocystis* au MEB permet alors de visualiser les structures filamenteuses des EPS. Leur structure est assez facilement distinguable de celle des pilis. Les observations MEB ont montré qu'une grande quantité de ces EPS sont présents dans une culture en phase exponentielle de *Synechocystis*, même après des étapes de lavages par centrifugation dans l'eau ultrapure. La présence de ces amas d'EPS pourrait expliquer l'agrégation importante de nanoparticules qui sont ainsi empêchées de venir au contact direct des cellules. Elle permettrait également de confirmer l'hypothèse émise, lors des mesures de mobilité électrophorétique, d'une adsorption sur une couche diffuse plus grande que la longueur de Debye (épaisseur de la double couche électronique, voir chapitre III et annexe).

Les nanoparticules de CeO_2 n'étant pas facilement observables au MEB (limite de résolution en taille), nous avons de nouveau eu recours à l'imagerie STEM/HAADF et à la cartographie XEDS.

IV.2.3.3 Visualisation des interactions EPS-NPs en cartographie XEDS

- **Visualisation des EPS chez *Synechocystis* en présence de NPs**

La Photo 25 présente une suspension de cellules de *Synechocystis* mise en contact pendant 3h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure. Les échantillons ont été fixés au glutaraldéhyde et colorés au bleu Alcian puis déposés directement à l'état liquide sur des grilles et observés (sans séchage, enrobage ni préparation préalable de coupes). Les cellules apparaissent sous forme agrégée (ce qui est conforme à ce qui a été décrit dans la partie IV.1 - floculation). À la différence des coupes observées précédemment en MET après déshydratation à l'éthanol, les échantillons contiennent une quantité importante de structures polymériques filamenteuses. Ces structures polymériques (EPS), déjà mises en évidence en MEB apparaissent denses aux électrons grâce à la coloration au bleu Alcian.

Une analyse de cet échantillon en cartographie EDS (Photo 26) confirme la présence de cérium sur les cellules ainsi que sur les EPS isolés. L'absence de CeO_2 en surface des cellules déduite des images MET était donc bien un artefact lié à la préparation des échantillons pour cette technique.

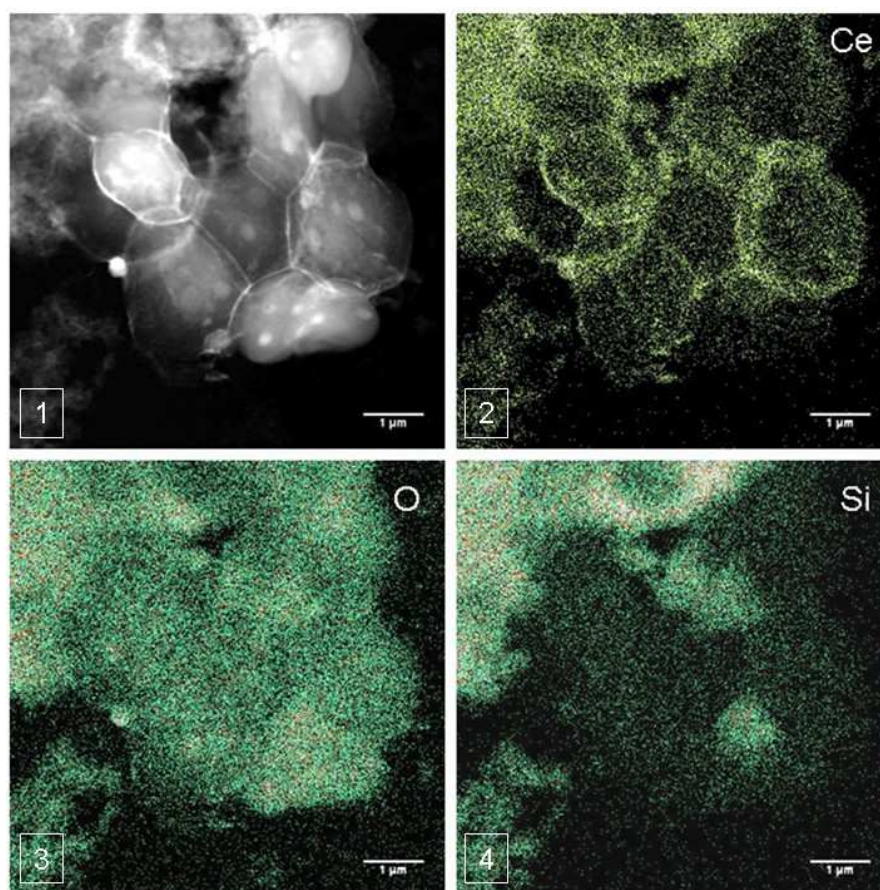


Photo 26 Observations HAADF et EDS de *Synechocystis* en contact 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 .

1 : image STEM/HAADF, 2 : cartographie obtenue avec la raie $L\alpha$ du cérium, 3 : cartographie avec la raie $K\alpha$ l'oxygène et 4 : cartographie avec la raie $K\alpha$ du silicium. Barre d'échelle : 1 μm .

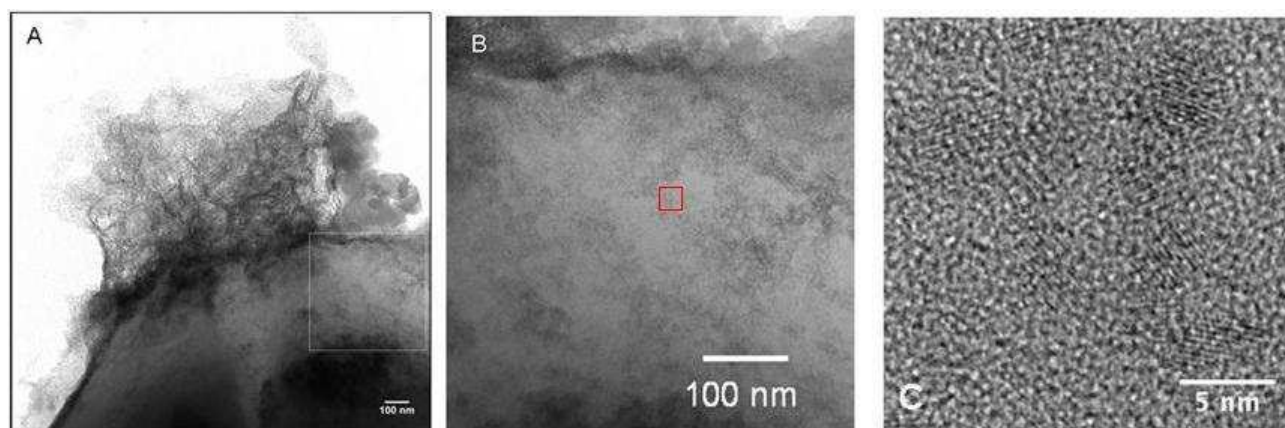


Photo 27 Observations MET d'une cellule de *Synechocystis* en contact pendant 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 .

Dépôt direct sur grille. A : partie d'une cyanobactérie avec des exopolysaccharides accrochés à la paroi de la cellule. B : agrandissement de la zone délimitée par le carré sur l'image A. C : image haute résolution correspondant à la zone délimitée par le carré sur l'image B.

La cartographie au seuil du silicium souligne les endroits de l'échantillon où les EPS sont présents en quantité importante. En effet, le silicium fait partie des éléments piégés par les exopolysaccharides (notamment dans les biofilms) (Vilchez *et al.*, 2007). Sur la cartographie au seuil du cérium (Photo 26), les contours de chaque cellule sont parfaitement délimitables. Ce n'est pas le cas pour les cartographies au seuil de l'oxygène et du silicium. Ce phénomène confirme la présence uniquement surfacique (et non intracellulaire) des nanoparticules par l'augmentation du signal dû aux effets de bord.

Afin de vérifier si les nanoparticules sont bien présentes uniquement sur les exopolysaccharides recouvrant la paroi cellulaire et non directement sur cette paroi, des agrandissements d'une photo MET d'une cellule ont été réalisés (Photo 27). Ces observations ont porté sur une partie d'une bactérie *Synechocystis* où des EPS étaient encore visiblement accrochés (photo A). Un agrandissement de la zone définie par le carré blanc sur la photo A permet de mettre en évidence la répartition inhomogène des nanoparticules à la surface de la cellule.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé cette répartition de nanoparticules avec celle d'*E. coli* pour laquelle l'adsorption est beaucoup plus homogène. Pour cela, un échantillon d'*E. coli* a également été observé en MET après coloration au bleu Alcian, sans étape de déshydratation et par dépôt liquide. Le résultat obtenu est présenté sur la Photo 28. La culture d'*E. coli* est également sous forme agrégée. Aucune structure confirmant la présence d'EPS n'est observée. Un agrandissement de la surface d'une des bactéries (photo B) montre la présence de nanoparticules de cérium réparties de façon homogène sur la bactérie. Les lignes noires plus denses sont supposées être des pilis sur lesquels il est possible de distinguer des chapelets de nanoparticules régulièrement espacées. Des images de diffraction et une cartographie EDS ont confirmé qu'il s'agissait de nanoparticules d'oxyde de cérium.

Ces observations en cartographie EDS et en MET ont permis de confirmer les hypothèses suivantes :

- 1) *E. coli* : recouvrement uniforme de sa paroi cellulaire par les nanoparticules de CeO_2 ,
- 2) *Synechocystis* : adsorption des nanoparticules de CeO_2 principalement sur ses EPS, ce qui empêchent les NPs de venir au contact direct des cellules.

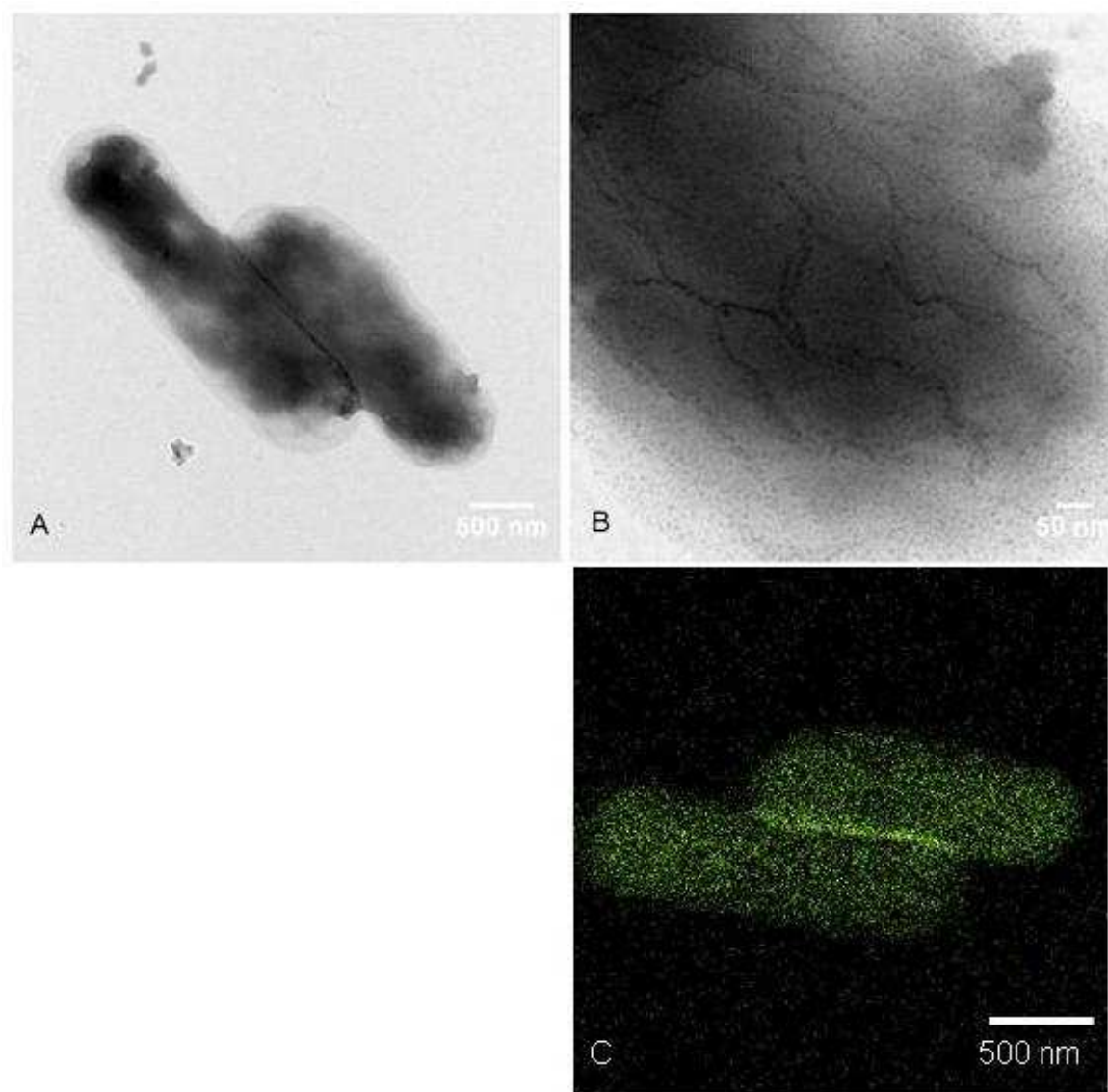


Photo 28 Observations MET de bactéries *E. coli* en contact pendant 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 .

Fixation au glutaraldéhyde et bleu Alcian, sans étapes de déshydratation dans l'éthanol, dépôt d'échantillon sous forme liquide sur grille.

A : : Image champ clair de deux bactéries agrégées. B : Agrandissement d'une partie de l'image A mettant en évidence la répartition quasi-uniforme des NPs de CeO_2 et (C) cartographie XEDS des deux bactéries réalisée avec la raie $L\alpha$ du cérium.

IV.2.3.4 Conclusion sur l'influence des EPS lors d'une mise en contact avec des NPs

Nous avons démontré que la présence des EPS chez *Synechocystis* joue un rôle majeur dans les phénomènes d'adsorption des nanoparticules à la surface de cette cyanobactérie. Les premières observations réalisées ont tout d'abord montré une adsorption très limitée (observations MET) voire une quasi-absence (cartographie EDS) de nanoparticules sur *Synechocystis* après incubation dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO₂. Ces observations auraient pu nous permettre de conclure à une absence d'interaction entre ces nanoparticules et *Synechocystis*. Cependant, les isothermes d'adsorption et les mesures de potentiel imposent la présence d'une adsorption importante. Les observations EDS réalisées sur des coupes de *Synechocystis* dans son milieu de culture en présence de nanoparticules ont permis de diriger les investigations sur le rôle de la présence de substances polymériques à la surface de *Synechocystis*.

En effet, ces substances extrêmement fragiles et labiles que sont les EPS ne supportaient pas les étapes de lavages (et notamment de déshydratation à l'alcool) qu'elles subissaient lors de la préparation des échantillons MET/EDS et étaient donc absentes des échantillons dans l'eau ultrapure lors de l'observation des coupes. Le fait que ces EPS soient visibles dans le cas où les cellules sont restées dans leur milieu de culture est attribué à un effet de sel. En effet, le sel écrante les répulsions électrostatiques des charges de surface (Figure 29), les polymères forment une couronne plus dense autour des bactéries les protégeant des étapes de lavages.

C'est l'adsorption des nanoparticules d'oxyde de cérium denses aux électrons sur les EPS qui les rend visibles en microscopie électronique. De la même façon, l'augmentation progressive de la mobilité électrophorétique de *Synechocystis* après le plateau d'adsorption est caractéristique d'une adsorption sur une couche diffuse, constituée par les EPS. En effet, elle n'est pas observée dans le cas d'*E. coli*. La description détaillée de la variation de la mobilité due à l'ajout des nanoparticules demanderait une modélisation complexe qui dépasse le cadre de cette thèse. On pourrait cependant suggérer une approche basée sur la description moderne de la mobilité de particules molles comme décrit dans le modèle de Duval et Ohshima (2006).

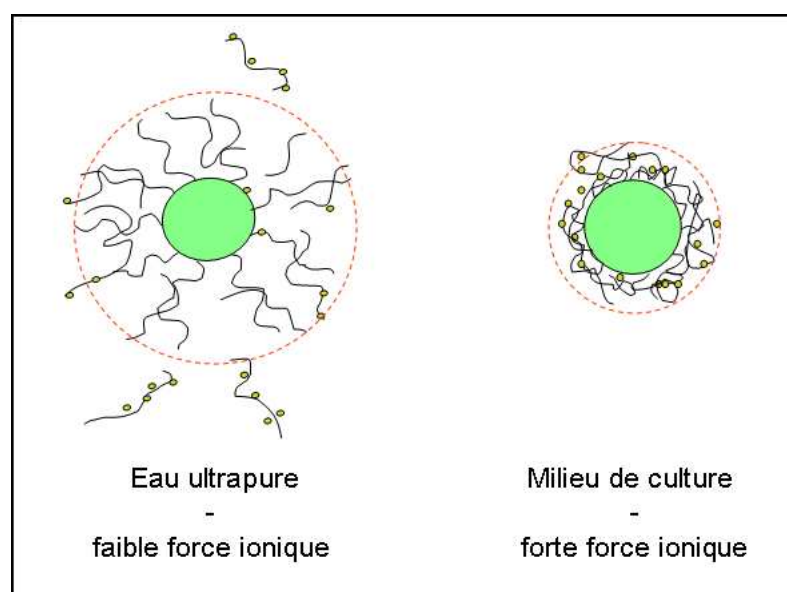


Figure 29 Représentation schématique de *Synechocystis* (vert) entourée de ses EPS recouverts de nanoparticules de CeO_2 (petits ronds jaunes).

Les EPS sont plus étendus dans l'eau ultrapure que dans le milieu de culture où les répulsions électrostatiques entre polymères sont limitées par la force ionique élevée.

Les observations MEB et EDS réalisées sur *Synechocystis* colorée au bleu Alcian, sans étapes de déshydratation dans l'alcool, nous ont permis d'observer ces EPS et de comprendre leur interaction avec les nanoparticules. En effet, les nanoparticules semblaient recouvrir entièrement la paroi des cellules. Cependant des analyses plus poussées de la répartition des nanoparticules à la surface des cellules, ont mis en évidence la relation intime entre les EPS et les nanoparticules. De plus, les observations après les lavages à l'alcool n'ayant montré aucune nanoparticule sur les cellules, nous pouvons en déduire que les nanoparticules sont adsorbées uniquement sur les EPS de *Synechocystis* et non sur sa paroi cellulaire.

Au contraire de *Synechocystis*, la souche d'*E. coli* utilisée ne synthétise pas d'EPS. Les nanoparticules sont donc adsorbées directement et de façon individualisée (c'est-à-dire sans formation d'amas) à la surface de la bactérie où elles forment une monocouche. Ces deux types d'adsorption de nanoparticules peuvent avoir des conséquences très différentes sur les mécanismes de toxicité.

Ainsi, si les études de toxicité sur des cellules (eucaryotes ou procaryotes) recommandent toujours d'étudier différents modèles biologiques et d'en spécifier les souches utilisées, rares sont celles qui mettent en exergue l'importance de la présence d'EPS dans les mécanismes de défense des bactéries contre les toxiques. Cette étude a pourtant démontré que leur présence joue un rôle déterminant lors des interactions entre nanoparticules et cellules. En effet, la présence d'EPS protège les espèces qui les synthétisent puisqu'elle limite le contact direct avec la paroi cellulaire. De plus, leur présence courante dans l'environnement (du fait de leur détachement des bactéries qui les synthétisent) en fait une source non négligeable de sites d'adsorption pour les nanoparticules. Celles-ci, si leur concentration reste limitée, se retrouvent alors piégées sous forme agrégée dans des réseaux polysaccharidiques et n'atteignent jamais les parois cellulaires des microorganismes. Ce phénomène est déjà connu dans les contextes de bioremédiation où les métaux toxiques ou lourds s'accumulent dans les biofilms (Vilchez *et al.*, 2007 et Harrison *et al.*, 2007). Cependant, la présence de ces polysaccharides ne protège pas le phytoplancton d'une floculation en présence de NPs, qui, comme nous l'avons vu précédemment, aurait des conséquences majeures non seulement sur la biomasse indispensable à la chaîne alimentaire, mais également sur le renouvellement de l'oxygène de l'atmosphère. Nous devons de plus garder en mémoire que ces exopolysaccharides servent également de sources de nutriments à d'autres espèces multicellulaires.

Nom	temps de contact	Volume de contact (ml)	Aire Ce ^{IV}	Aire Ce ^{III}	Aire Si 2s	Ce total/Si	Ce ^{IV} /Si	Ce ^{III} /Si	CeIII/Cetotal
H ₂ O - 3h	3h	5	75572	88400	6611	25	11	13	0,54
H ₂ O + <i>E.coli</i> - 3h	3h	5	57365	87653	4995	29	11	18	0,60
H ₂ O + <i>Synechocystis</i> - 3h	3h	5	71492	105043	5722	31	12	18	0,60
LB - 3h	3h	5	67709	47237	4343	26	16	11	0,41
LB + <i>E.coli</i> - 3h	3h	5	45319	72409	3620	33	13	20	0,62
MM - 3h	3h	5	98299	96010	6247	31	16	15	0,49
MM + <i>Synechocystis</i> - 3h	3h	5	42893	85286	4267	30	10	20	0,67

Tableau 5 - Tableau résumant les conditions de préparation des échantillons analysés en XPS et les intégrations des pics correspondant au cérium.

Par colonne, de gauche à droite : le nom des échantillons, le temps de contact dans le milieu étudié, le volume utilisé, l'aire intégrée correspondant aux pics d'émission 3d du Ce^{IV} et du Ce^{III} et au pic 2s du Si. Les colonnes suivantes : rapport des aires du cérium total, Ce^{IV} et Ce^{III} par rapport à l'aire du silicium. Dernière colonne : rapport des aires entre le cérium au degré d'oxydation 3 et le cérium total.

	a(t) hauteur totale de la NP (nm)	c(t) rayon de la NP (nm)	b(t) hauteur de la couche de CeIII (nm)	A(t) épaisseur de la couche de CeIII (nm)
H ₂ O - 5min	1,7	3,4	0,5	0,4
H ₂ O - 3h	1,0	2,8	0,5	0,5
H ₂ O + <i>E.coli</i> - 3h	1,3	2,7	0,6	0,7
H ₂ O + <i>Synechocystis</i> - 3h	1,2	2,9	0,6	0,6
LB - 3h	1,5	2,3	0,5	0,3
LB + <i>E.coli</i> - 3h	1,4	2,7	0,6	1,2
MM - 3h	2,7	2,7	0,4	0,9
MM + <i>Synechocystis</i> - 3h	2,4	2,4	0,7	1,2

Tableau 6 - Tableau résumant la réduction-dissolution d'une nanoparticule dans différentes conditions de contact (modèles biologiques et/ou milieux) et suivant le modèle présenté en II.

L'étude des mécanismes de toxicité par ingestion de ces nanoparticules agrégées à ces composés organiques sur d'autres cibles biologiques serait une perspective intéressante à ce travail.

IV.3 Mécanismes d'oxydoréduction lors d'un contact nanoparticules/cellules

Nous avons observé l'effet d'un contact entre nanoparticules et cellules aux échelles macroscopique et microscopique du point de vue de la cellule, mais qu'en est-il du point de vue de la nanoparticule ? La partie suivante a pour objectif de déterminer la spéciation des atomes de cérium après contact avec des cellules de *Synechocystis* et *E. coli* à l'aide de deux techniques complémentaires : l'analyse par spectroscopie en photoémission de rayons X (XPS) et la spectroscopie d'absorption de rayons X près du seuil (X Ray Absorption Near Edge Spectroscopy, XANES).

IV.3.1 Analyses XPS

Les analyses XPS ont été réalisées de la même manière que lors du suivi de la dissolution des nanoparticules (III, 2.4) à la différence que les micas recouverts de nanoparticules de CeO_2 ont incubé non pas seulement dans l'eau mais également en présence des cellules et de leurs milieux de culture pendant 3h (voir matériels et méthode). Le Tableau 5 répertorie les différentes conditions étudiées et les aires correspondantes au Ce^{IV} et Ce^{III} . Les aires obtenues pour le Ce^{III} et le Ce^{IV} ont été modélisées à l'aide du modèle de dissolution-réduction établi précédemment (III.2.4) afin d'obtenir des informations sur l'évolution des tailles et composition des nanoparticules (Tableau 6).

La condition « H_2O -5 min » (données présentées partie III, 2.4) a été ajoutée comme témoin initial. Les nanoparticules soumises aux différentes conditions montrent toutes un comportement de réduction-dissolution (Figure 30). On constate que la proportion de Ce^{IV} reste identique avec ou sans cellules dans l'eau ultrapure. Les phénomènes d'oxydoréduction ne semblent donc pas être particulièrement favorisés par la présence d'*E. coli* ou *Synechocystis* dans l'eau ultrapure. Les échantillons ayant incubé avec les cellules dans l'eau sont cependant légèrement moins dissous que le témoin sans cellule, or nous avons vu qu'il existe des interactions fortes entre cellules et nanoparticules dans l'eau (voire les observations

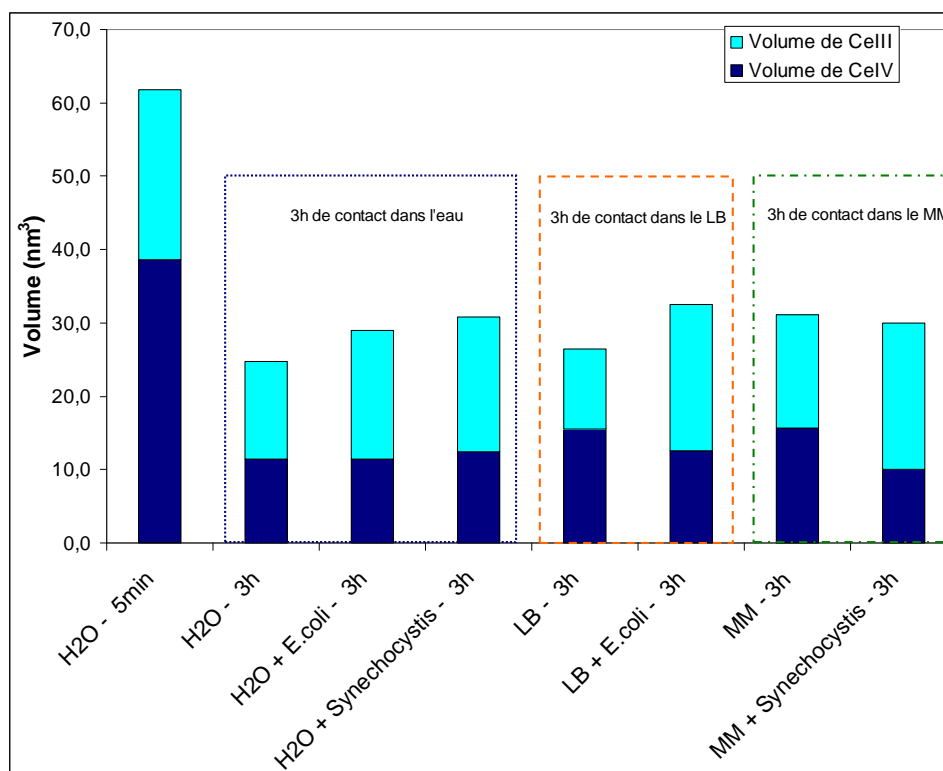


Figure 30 - Histogramme représentant le volume d'une NP et le volume correspondant de Ce^{III} après des contacts de 3h dans différents milieux avec ou sans cellules.

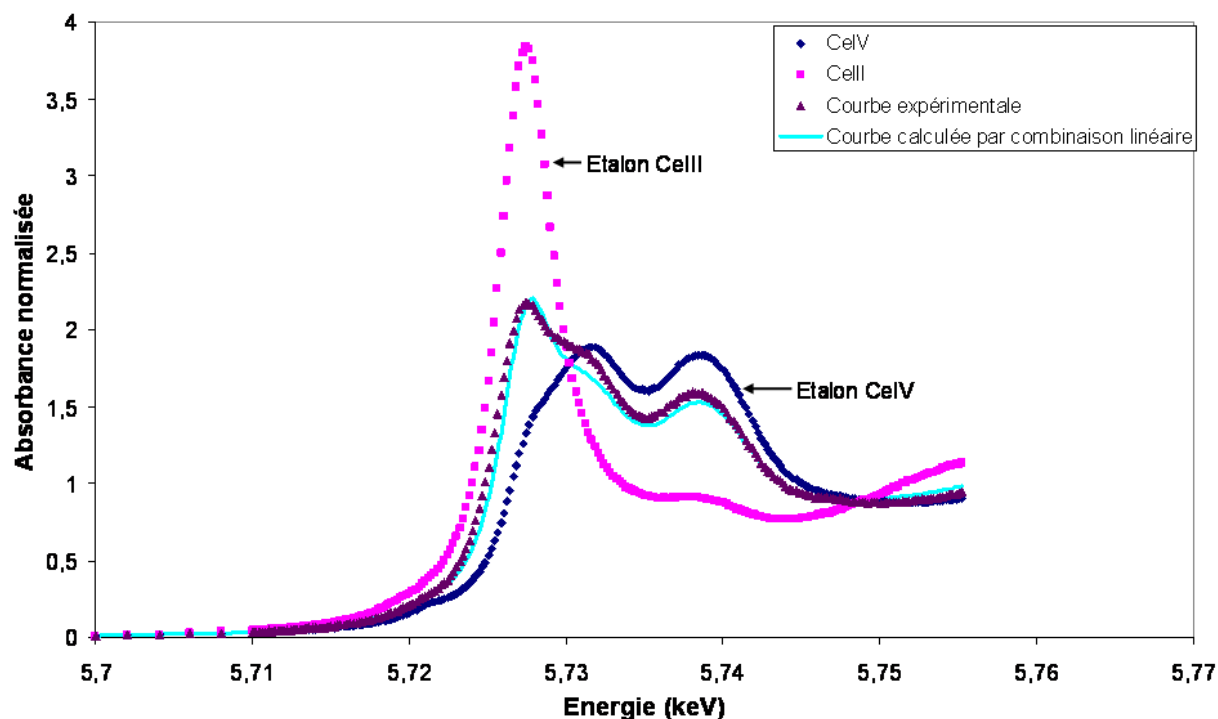


Figure 31 Spectre d'absorbance XANES de NPs CeO₂ ayant subies un contact avec des bactéries au seuil L3 du cérium obtenue à l'ESRF.

La courbe calculée est une modélisation de la courbe expérimentale. Elle est obtenue par combinaison linéaire d'un étalon contenant du Ce^{IV} avec un étalon de Ce^{III}. Les coefficients linéaires résultants permettent de quantifier le ratio de Ce^{III} et Ce^{IV} présents dans l'échantillon.

réalisées en MET), il est donc probable que la couche de nanoparticules déposée sur mica soit recouverte d'une couche de cellules qui limite l'étape de dissolution. Dans le cas du milieu LB, la réduction est moins importante que dans l'eau ultrapure en effet, la quantité de Ce^{IV} est plus importante dans le LB après 3h que dans l'eau. En revanche la présence d'*E.coli* dans le LB induit une réduction plus importante des nanoparticules, et la dissolution est de nouveau plus limitée en présence de bactéries. Dans le milieu MM, la dissolution et la réduction sont aussi plus limitées que dans l'eau ultrapure. De même que pour *E.coli*, la présence de *Synechocystis* dans le milieu de culture favorise la réduction mais limite la dissolution.

IV.3.2 Analyses XANES

Les phénomènes de réduction entre nanoparticules et cellules ont également été suivis en absorption des rayons X (XANES) au seuil d'énergie L3 du cérium. Ces expériences ont été réalisées sur la ligne BM 30b du synchrotron ESRF.

Une première série d'échantillons a été analysée en milieu solide. Les nanoparticules ont préalablement été mises en contact avec des cellules dans différents milieux (eau, LB, MM). Après 3h d'incubation, les échantillons ont été congelés à l'azote liquide puis lyophilisés. Les lyophilisats ont été mélangés à du bromure de potassium pour former des pastilles ensuite analysées en fluorescence avec utilisation d'un cryostat à $-172\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le bruit de fond a été soustrait aux courbes d'absorbance qui ont été ensuite normalisées puis modélisées par combinaison linéaire des spectres obtenus pour les nanoparticules de CeO_2 pures (majoritairement composées de Ce^{IV}) et pour le CeCl_3 (majoritairement Ce^{III}) (Briois *et al.*, 2005 et Zhang *et al.*, 2004). Les concentrations relatives de Ce^{IV} et Ce^{III} ont été déduites des combinaisons linéaires obtenues (Figure 31).

Le Tableau 7 présente un résumé des résultats obtenus sur la série d'échantillons solides. D'après ces analyses, la réduction subie par les nanoparticules dans l'eau est similaire à celle subie dans le LB : environ 10 %. La réduction reste plus limitée dans le MM où elle atteint maximum 5 %. Il faut cependant noter que les calages expérimentaux par combinaison linéaire permettant de déterminer la fraction de Ce^{III} avec une précision de 5 % seulement, ceci est limitant pour quantifier des réductions faibles. Dans l'eau en présence des cellules biologiques (*Synechocystis* et *E.coli*) les nanoparticules sont à peine plus réduites que dans l'eau seule (10-15%). Dans le milieu de culture MM en présence de *Synechocystis*, les nanoparticules subissent une réduction faible et égale à celle subie dans le MM seul.

	Echantillons	Ce ^{III} /Ce
Milieux et eau	MM - 3h	<5%
	H ₂ O - 3h	10%
	LB - 3h	10%
Bactéries + H₂O	H ₂ O + <i>Synechocystis</i> - 3h	15%
	H ₂ O + <i>E.coli</i> - 3h	10-15%
Bactéries + milieux	MM + <i>Synechocystis</i> - 3h	5%
	LB + <i>E.coli</i> - 3h (concentrations fortes)	20-30%
	LB + <i>E.coli</i> - 3h (concentrations faibles)	50%

Tableau 7 - Résumé des quantifications Ce^{III}/Ce obtenues en XANES pour différentes conditions de contact.

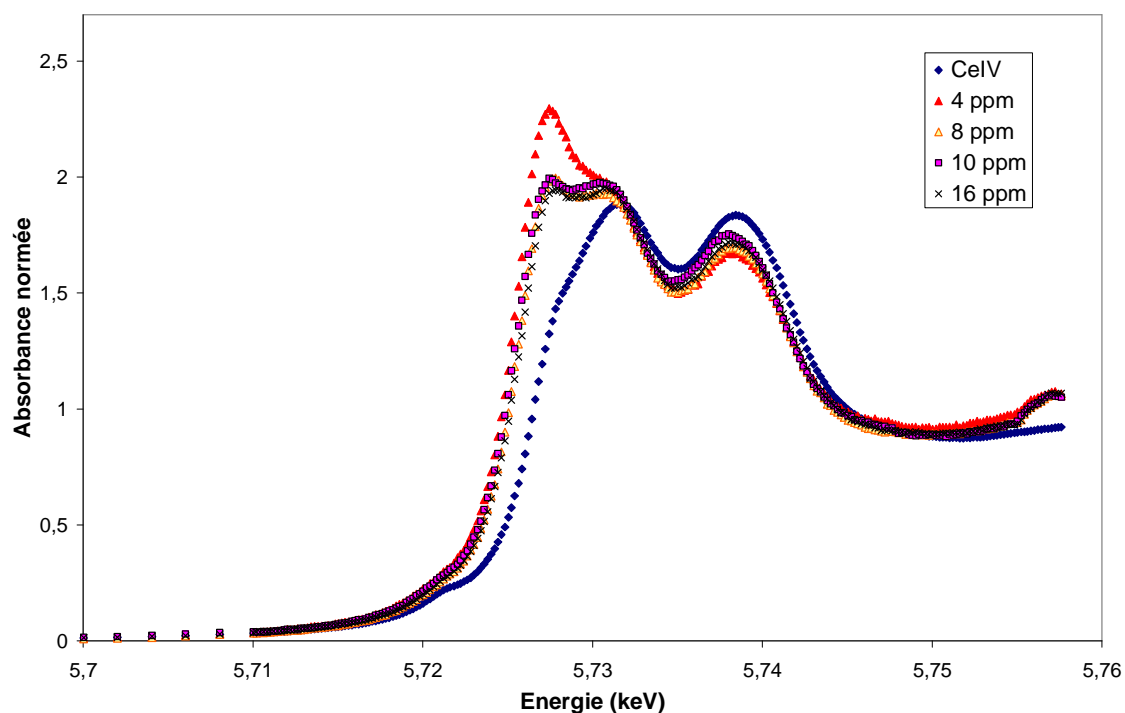


Figure 32 Spectres XANES de pastilles des échantillons « LB + *E. coli* - 3h » à différentes concentrations en nanoparticules de CeO₂. Les concentrations correspondent aux concentrations en CeO₂ dans les échantillons liquides avant lyophilisation.

En revanche, les nanoparticules présentent une réduction beaucoup plus importante dans le milieu LB en présence d'*E. coli*. Plus la concentration en nanoparticules y est faible et plus la réduction est proportionnellement importante. Ceci est illustré sur le graphique Figure 32.

Ces résultats confirment des observations antérieures réalisées sur la ligne LUCIA (Thill *et al.*, 2006). On notera cependant que des échantillons préalablement analysés sur LUCIA ont été réanalysés sur BM30b (sur des zones différentes des échantillons) et ont montré des réductions nettement inférieures (diminution de 80% de réduction à 50%); peut-être la conséquence d'une réduction sous faisceau sur LUCIA. En effet, cette ligne possède un microfaisceau de densité de photons 10^6 fois plus grande que sur la ligne BM30b de l'ESRF, ce qui a pu forcer la réduction des échantillons. Nous avons confirmé que ce phénomène de réduction sous faisceau était absent à BM30b en comparant les échantillons soumis à des temps plus ou moins longs d'analyse.

Une deuxième série d'expériences a été également tentée sur des échantillons liquides afin de suivre la cinétique de réduction du cérium en présence de cellules (protocole décrit dans la partie matériels et méthodes). Cependant, les concentrations de cérium dans les suspensions cellulaires étaient en limite de détection de la ligne, les échantillons ont donc été préalablement concentrés (5 fois) par centrifugation. Malgré cela, les temps d'acquisition (15 min) imposés par la résolution cinétique recherchée étaient trop courts pour permettre une modélisation correcte des spectres. De ce fait, l'extraction objective des taux de Ce^{III} s'est avérée impossible.

Les résultats communs aux deux techniques d'analyse (XPS et XANES) sont les suivants :

- une absence de réduction dans l'eau ultrapure en présence des deux types de cellules (quantité de Ce^{IV} identique à celle trouvée dans l'eau seule) et
- une réduction du Ce^{IV} en Ce^{III} (visible par la diminution de la quantité de Ce^{IV}) dans le milieu LB en présence de cellules d'*E. coli*.

Les analyses XPS montrent également un phénomène de réduction en présence de cellules de *Synechocystis* dans le MM, mais ceci n'a pas été confirmé par les analyses XANES, probablement à cause d'une différence dans la géométrie de l'expérience. En effet, dans le cas de l'XPS, les cellules sont majoritaires par rapport aux nanoparticules seulement présentes sur la surface du mica. De plus dans le cas du XANES, le contact a lieu, non pas avec une surface

macroscopique de nanoparticules, mais avec des nanoparticules individualisées. Il faut également noter que l'analyse XANES permet la spéciation de l'ensemble des atomes de cérium présents en solution tandis que l'XPS analyse uniquement les nanoparticules encore restantes sur le mica. Pour toutes ces raisons, il est délicat d'extrapoler les résultats obtenus en XPS à ceux obtenus en XANES.

IV.3.3 Conclusions sur les mécanismes d'oxydoréduction

Ces expériences ont mis en évidence une absence de réduction des nanoparticules lorsqu'elles sont en contact de cellules dans l'eau. En revanche, dans les milieux de culture, la réduction semble dépendre du modèle biologique et du type de contact entre nanoparticules et cellules. En effet, il y a :

- réduction dans le cas d'*E. coli*,
- réduction absente ou limitée dans le cas d'un contact avec *Synechocystis*.

Le fait qu'aucune réduction ne soit observée dans l'eau en présence d'*E. coli* laisse supposer, dans le LB, un mécanisme de réduction du cérium induit par *E. coli*. En effet, si la réduction observée était simplement la résultante d'une oxydation des bactéries par les nanoparticules (hypothèse concevable vue le contact intime entre nanoparticules et bactéries), cette réduction serait également observée dans l'eau. La réduction est donc bien induite par les bactéries dans leur milieu culture, probablement par la production de radicaux libres, et non par les nanoparticules.

Les radicaux libres sont naturellement produits par les cellules et sont nécessaires à leur bon fonctionnement. Ils sont notamment impliqués dans des mécanismes de régulation destinés à répondre au stress oxydant et à rétablir l'homéostasie de la cellule (Droge, 2002). Cependant, de trop fortes concentrations en radicaux libres peuvent conduire à des modifications irréversibles des protéines et acides aminés cellulaires (espèces les plus sensibles aux phénomènes redox). Ils peuvent même à terme entraîner la mort cellulaire (Droge, 2002). De plus, de récentes études ont montré une augmentation de la durée de vie de cellules exposées à des nanoparticules d'oxyde de cérium (Karakoti *et al.*, 2008). Selon ces auteurs, les défauts électroniques présents dans les nanoparticules permettent à ces dernières de jouer le rôle « d'éponges » à radicaux libres en passant de l'état d'oxydation 4 à l'état d'oxydoréduction 3 du cérium. La concentration en radicaux libres dans le milieu de culture serait ainsi diminuée, ce qui favoriserait le prolongement de la vie cellulaire.

Le fait qu'aucune réduction ne soit observée dans l'eau ultrapure réside sans doute dans le ralentissement du métabolisme des cellules. En effet, l'eau ultrapure est dépourvue des nutriments indispensables aux réactions métaboliques d'oxydoréduction. Ceci limite donc la production des radicaux libres. De plus, la différence de pression osmotique provoquée par l'absence de sels conduit probablement à une limitation des échanges entre l'intérieur de la cellule et l'extérieur. Les radicaux libres sont, de ce fait, moins libérés dans le milieu de culture.

Concernant *Synechocystis*, la réduction très limitée est probablement due à la présence d'exopolysaccharides. En effet, d'après Liu *et al.*, 2007, les EPS protègent les cellules qui les possèdent des effets des irradiations en piégeant les radicaux libres. De plus, la réduction observée chez *E. coli* dépend de la quantité de bactéries en contact direct avec les nanoparticules. Le contact direct étant évité par la présence d'EPS dans le cas des expériences réalisées en milieu dispersé liquide (cas XANES), ceci explique l'absence de phénomènes de réduction. On aurait tout de même pu s'attendre à des phénomènes de réduction entre EPS et NPs car le Ce^{IV} est utilisé comme catalyseur dans les réactions de polymérisation vinylique du glucose et de la cellulose (Pottenger and Johnson, 1970) et également de polymérisation par émulsion des alkylcyanoacrylates (Chauvierre *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré qu'il produit des radicaux libres sur la cellulose (Pottenger and Johnson, 1970) et sur le dextran (Chauvierre *et al.*, 2003) par formation d'un complexe de coordination. Ce n'est cependant pas ce qui a été observé dans cette étude probablement à cause du pH du milieu de contact qui est nettement supérieur au pH utilisé dans ce type de réaction de polymérisation où $pH \approx 1$.

Il reste à présent à vérifier l'impact d'une incubation en présence de nanoparticules sur les réponses cellulaires (croissance, mortalité, intégrité membranaire) et à les confronter aux mécanismes d'oxydoréduction observés. Ceci sera l'objet du chapitre suivant.

IV.4 Matériels et méthodes

IV.4.1 Electrophorèse capillaire

Les cultures de bactéries (*Synechocystis* et *E. coli*) ont été cultivées dans leur milieu respectif puis lavées dans l'eau ultrapure de la façon décrite dans la partie matériels et méthodes II.3.3. Puis les cultures ont été aliquotées en fractions de 2 mL. L'ajout de 100 μL de dilutions de suspensions de NPs de CeO_2 initialement à $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (préalablement stérilisée par filtration sur filtre 0,22 μm) aux fractions de suspensions cellulaires est effectué sous agitation (vortex). Les cultures contenant les nanoparticules ont ensuite été placées dans leurs incubateurs respectifs pendant 30 min. A l'issue de cette période d'incubation, les cultures ont été centrifugées (10 min à 4 500 g) et 1mL de chaque surnageant a été prélevé puis analysé en électrophorèse capillaire.

Chacune des séries d'échantillons a été doublée pour s'assurer de leur reproductibilité.

La méthode d'analyse par électrophorèse capillaire a préalablement été validée par construction d'une isotherme d'adsorption de nanoparticules d'oxyde de cérium sur un modèle connu : des billes de latex (voir annexe p.313).

- **Dissolution des NPs pour l'analyse en électrophorèse capillaire**

Les nanoparticules de CeO_2 ayant une grande affinité pour le verre, leur adsorption sur le capillaire en silice fondu de l'électrophorèse capillaire risquait de fausser les analyses. Les analyses par électrophorèse capillaire ont donc nécessité une étape préliminaire de réduction-dissolution des nanoparticules d'oxyde de cérium afin de les transformer en cations Ce^{3+} analysables en électrophorèse. Cette étape a été réalisée par l'ajout d'acide sulfurique concentré (dissolution des nanoparticules) et de sel de Mohr (réduction des nanoparticules).

Le sel de Mohr $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2, 6\text{H}_2\text{O}$ a été préparé par dissolution de 38 g du solide dans 20 mL d'acide sulfurique concentré. La solution à 0,5 M ainsi obtenue a ensuite été diluée 50 fois afin de travailler avec une solution à 10 mM.

La quantité de sel de Mohr à ajouter a été calculée afin d'obtenir une réduction totale du cérium, tout en limitant l'ajout d'acide sulfurique. Celui-ci est en effet responsable de phénomènes de saturation de l'électrophorèse capillaire lorsque qu'il est présent en trop grande quantité dans les échantillons.

Afin d'établir le bilan de matière, la quantité maximale de nanoparticules potentiellement présentes en solution a été calculée à partir de l'échantillon contenant la concentration initiale maximale en nanoparticules.

Equation bilan : $\text{Ce}^{4+}(\text{nanoparticules}) + \text{Fe}^{2+}(\text{sel de Mohr}) \rightarrow \text{Ce}^{3+} + \text{Fe}^{3+}$

Le ratio idéal (pour ne pas saturer l'électrophorèse mais réduire l'intégralité des atomes de cérium) a donc été établi pour : 150 μL de sel de Mohr (10 mM) et 400 μL d'échantillon.

- **Préparation de l'électrolyte pour l'analyse en électrophorèse capillaire**

L'électrolyte utilisé pour les analyses en électrophorèse capillaire a été préparé par ajout à 100 mg d'eau ultrapure de: 68 mg d'acide α -hydroxy-isobutyrique (HIBA, Aldrich) jouant le rôle d'agent complexant des cations et 64 μL du chromophore UV-CAT1 (fournisseur : Waters). L'électrolyte a été homogénéisé pendant 24h par agitation magnétique avant utilisation. Le pH final de l'électrolyte était d'environ 4.

- **Analyses en électrophorèse capillaire**

Les analyses ont été réalisées sur une électrophorèse Beckman Coulter (P/ACE MDQ) avec un capillaire adapté à la détection des cations. Les mesures ont été réalisées à une tension de 25,2 kV.

IV.4.2 Mobilité électrophorétique

Les échantillons qui ont servi à la mesure de la mobilité électrophorétique ont été préparés de la même manière que ceux mesurés pour l'isotherme d'adsorption. Les cultures ont été lavées dans l'eau puis mises en contact avec une solution de nanoparticules pendant 30 min - 1h (prise en compte du temps d'analyse). Les mesures de mobilité électrophorétique ont été effectuées à l'aide d'un zétasizer Nano ZS de marque Malvern. Les échantillons ont été placés dans des cellules en plastique jetables. Les mobilités ont été mesurées par un système de mesure de vitesse à l'aide d'un laser à effet Doppler. Ce type de mesure utilise la technique du retournement de champ électrique (inversion des bornes électriques aux électrodes). Le mode de mesure utilisé a été le mode *General Purpose*, combinaison du retournement de champ rapide (FFR : fast field reversal) afin d'éviter l'électroosmose et retournement de champ lent (SFR : slow field reversal) afin d'éviter l'électrodéposition.

IV.4.3 Microscopie électronique en transmission (MET)

Les cultures de *Synechocystis* et *E. coli* lavées dans les milieux étudiés ont été mises en contact pendant 3h en présence des nanoparticules de CeO₂ (conditions identiques à celles décrites dans le matériel et méthode II.3.3)

Les échantillons ont ensuite été fixés par du glutaraldéhyde 2,5 % pendant une heure (ajout de 0,2 mL de glutaraldéhyde 25% aux 2 mL d'échantillon). L'ajout du fixateur permet de conserver l'état morphologique des bactéries à un moment donné. Cette étape tue les cellules. Après une heure d'incubation, les échantillons ont été lavés plusieurs fois (par des cycles de centrifugation et remplacement du surnageant) avec de l'eau ultrapure. Puis une solution de métaperiodate à 1 % a été ajoutée aux échantillons et laissée incuber 15 min afin de rendre la paroi des bactéries perméable aux colorants. Cette étape a de nouveau été suivie de plusieurs lavages des échantillons à l'eau ultrapure. Puis les échantillons ont été mis à incuber dans 0,5 mL de milieu Karnovsky (fixateur et colorant membranaire) pendant 1h30. Ce milieu est composé de : 1% de tétraoxyde d'osmium, et 15 mg/mL de ferrocyanide de potassium. Après 1h30 d'incubation les échantillons ont été lavés 3 fois à l'eau ultrapure et centrifugés, puis les culots ont été enrobés dans 70 µL d'une solution d'Agar 2 %. Après gélification, les inclusions ainsi obtenues ont subi des étapes de déshydrations successives dans des bains d'alcool de concentrations croissantes, puis ont été lentement infiltrées par la résine Epon pendant 18h. Les échantillons ont ensuite été coulés dans des moules, placés quelques minutes sous vide (pour retirer les bulles d'air de la résine) et laissés à polymériser pendant plusieurs jours (jusqu'à durcissement complet de la résine).

Les moulages obtenus ont ensuite été découpés à l'aide d'un couteau à diamant (Diatome AG) en sections ultrafines de 90 nm d'épaisseur dans un microtome (UCT-FCS ; Leica Microsystems). Ces coupes ultrafines ont été déposées sur des grilles de nickel recouvertes d'une pellicule carbonée (carbon-formvar nickel grid, Agar Scientific) et colorées avec du citrate de plomb (Reynold's lead) ou de l'acétate d'uranyle. Les observations des coupes ont été réalisées avec un microscope Philips CM12 à 80 kV équipé d'une caméra US1000 Gatan.

IV.4.4 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les échantillons observés ont été des cultures de *Synechocystis* repiquées plusieurs fois en phase exponentielle, puis lavées trois fois dans l'eau ultrapure et laissées à incuber pendant 3h

dans un incubateur agité lumineux à 30°C. Les échantillons ont ensuite été fixés à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % contenant 0,15 % de bleu Alcian. Les échantillons ont incubé une nuit dans la solution de fixation (glutaraldéhyde et bleu alcian), puis ont été lavés trois fois à l'eau ultrapure par des étapes de centrifugation et remplacement du surnageant. Certains échantillons ont également subi des étapes de déshydratation par lavages dans des bains contenant des concentrations croissantes en éthanol. Après ces étapes, les échantillons ont été centrifugés puis le culot des échantillons a été déposé (sous forme de pâte) sur des clous en aluminium (fournisseur : Agar scientifique). Ces clous ont été placés dans un appareil de séchage au point supercritique du CO₂. La cavité a été remplie par de l'isopropanol. Celui-ci a pris la place de l'eau dans l'échantillon. Puis la cavité a progressivement été remplie par du CO₂ liquide, miscible à l'isopropanol. Par variation de pression et température le CO₂ a été transformé en vapeur, séchant ainsi l'échantillon. Les échantillons ont ensuite été métallisés pendant 30 s à 40 mV par une source Or-Palladium. Puis observés sur un microscope MEB Hitachi.

IV.4.5 Analyse dispersive en énergie (XEDS)

- **Echantillons en couche mince**

Les échantillons analysés ont été les mêmes que ceux préparés pour l'expérience de MET. La localisation des nanoparticules a été réalisée sur un microscope JEOL 2100F TEM/STEM à 200 kV. La technique d'imagerie électronique en transmission à balayage a été couplée à un détecteur champ sombre annulaire à grand angle (High Angle Annular Dark Field HAADF) permettant d'obtenir un bon contraste en Z. La spectroscopie d'analyse dispersive en énergie (XEDS) a permis d'établir des cartographies élémentaires des échantillons observés.

- **Echantillons liquides**

Les cultures de *Synechocystis* et *E. coli* ont été cultivées classiquement, puis lavées 3 fois dans de l'eau ultrapure. Elles ont ensuite été mises en contact pendant 2h avec 240ppm de nanoparticules de CeO₂ dans leurs incubateurs respectifs. Après ce temps d'incubation, les échantillons ont été centrifugés pendant 5 min à 4500 G et le surnageant a été remplacé par un mélange : glutaraldéhyde (2,5 %) et bleu Alcian (1,5 %). Les cultures ont incubé avec ce mélange pendant 10 min, puis le fixateur a été retiré par lavages à l'eau ultrapure. Une goutte des échantillons a ensuite été déposée directement sur une grille Ni-Cu recouverte d'une pellicule carbonée, laissée à reposer pendant 10 min (pour permettre la décantation des



ESRF, ligne BM30b, Avril 2007

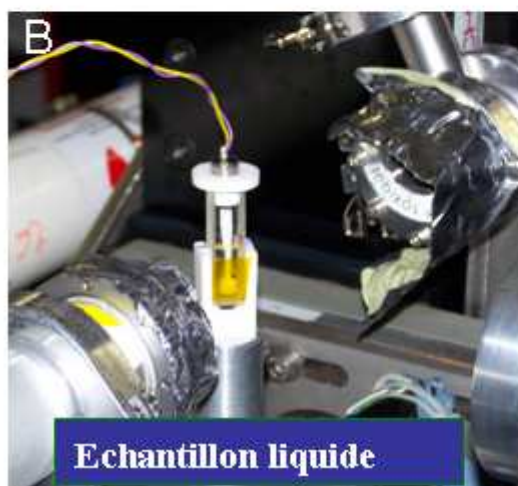


Figure 33 Environnement échantillon des mesures XANES réalisées sur la ligne BM30b de l'ESRF.
A : vue d'ensemble, B : Vue d'un échantillon liquide agité, C : Vues d'un échantillon solide.

bactéries sur la grille) puis l'excédent de liquide a été retiré à l'aide d'un papier absorbant avant d'être introduit dans le MET. Les observations ont été réalisées sur un microscope JEOL 2100F TEM/STEM à 200 kV, couplé à un détecteur HAADF. La spectroscopie d'analyse dispersive en énergie (XEDS) a permis d'établir des cartographies élémentaires des échantillons observés.

IV.4.6 Spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES)

Les échantillons ont été préparés à partir de cultures de *Synechocystis* et d'*E. coli* lavées dans le milieu de l'étude (voir II.3.3) puis aliquotées en fractions de 6 mL dans lesquelles a été ajouté (sous agitation par vortex) 1 mL de différentes suspensions de NPs de CeO₂ de concentrations inférieures ou égales à 10 g/L. Les suspensions cellulaires ont été mises à incuber pendant 3h dans les incubateurs adaptés aux bactéries utilisées puis congelées à l'azote liquide et lyophilisées. Remarque : les échantillons contenant seulement les milieux sans les bactéries ont également subis ces étapes du protocole.

Les lyophilisats ont été mélangés à du KBr pour former des pastilles analysées sur la ligne BM 30b du synchrotron ESRF (Figure 33). Les échantillons ont été placés dans un cryostat d'azote liquide pour les acquisitions longues afin d'éviter que le faisceau n'endommage les échantillons. L'analyse a été effectuée en fluorescence à l'aide d'un détecteur 30 éléments au seuil L3 du cérium (5723 eV). Les données ont été traitées suivant la procédure classique : soustraction du pré-seuil, normalisation et modélisation par combinaisons linéaires de spectres Ce^{III} et Ce^{IV}.

Pour les échantillons liquides, les cultures de *Synechocystis* et *E. coli* ont été cultivées et lavées comme décrit dans le matériel et méthode du chapitre II. Différentes conditions ont été testées : les suspensions cellulaires non concentrées (soit OD=0,5 pour *Synechocystis* et OD=2 pour *E. coli*), les suspensions concentrées 3 fois (dans différents milieux de contact : eau, MM, LB) et les cultures concentrées 5 fois. Pour certains essais les cultures ont été concentrées après contact avec les NPs. Les suspensions cellulaires ont ensuite été placées dans une cuve de mesure de spectroscopie en plastique, la face de la cellule dirigée face au faisceau étant percée d'un trou recouvert de kapton. Quelques microlitres d'une suspension de CeO₂ NPs à 10 g/L ont ensuite été ajoutés à la suspension cellulaire (concentrations finales en CeO₂ entre 10 et 100ppm). Les cellules ont été maintenues en suspension pendant la mesure grâce à un petit agitateur en téflon (voir Figure 33).

IV.5 Références bibliographiques

- [Briois *et al.*, 2005] Briois, V., Lutzenkirchen-Hecht, D., Villain, F., Fonda, E., Belin, S., Griesebock, B., and Frahm, R. (2005). Time-resolved study of the oxidation of ethanol by cerium (iv) using combined Quick-XANES, UV-Vis, and Raman spectroscopies. *J. Phys. Chem. A*, 109:320–329.
- [Chauvierre *et al.*, 2003] Chauvierre, C., Labarre, D., Couvreur, P., and Vauthier, C. (2003). Radical emulsion polymerization of alkylcyanoacrylates initiated by the redox system dextran-cerium(iv) under acidic aqueous conditions. *Macromolecules*, 36:6018–6027.
- [Collic-Jouault *et al.*, 2004] Collic-Jouault, S., Zanchetta, P., Helley, D., Ratiskol, J., Sinquin, C., Fischer, A., and Guezennec, J. (2004). Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en thérapeutique humaine. *Pathologie Biologie*, 52 (3):127–130.
- [Drews and Weckesser, 1982] Drews, G. and Weckesser, J. (1982). Function, structure and composition of cell walls and external layer. *The Biology of Cyanobacteria*, S:333–356.
- [Droge, 2002] Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82(1):47–95.
- [Duval and Ohshima, 2006] Duval, J.F.L. and Ohshima, H. (2006). Electrophoresis of Diffuse Soft Particles. *Langmuir*, 22 : 3533-3546.
- [Erlandsen *et al.*, 2004] Erlandsen, S. L., Kristich, C. J., Dunny, G. M., and Wells, C. L. (2004). High-resolution visualization of the microbial glycocalyx with low-voltage scanning electron microscopy: Dependence on cationic dyes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(11):1427–1435.
- [Harrison *et al.*, 2007] Harrison, J. J., Ceri, H., and Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12):928–938.
- [Jürgens *et al.*, 1983] Jürgens, U., Drews, G., and Weckesser, J. (1983). Primary structure of the -peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *synechocystis* sp. strain pcc 6714. *Journal of Bacteriology*, 154 - 1:471–478.

- [Karakoti *et al.*, 2008] Karakoti, A., Monteiro-Riviere, N., Aggarwal, R., Davis, J., Narayan, R., Self, W., McGinnis, J., and Seal, S. (2008). Nanoceria as antioxidant: Synthesis and biomedical applications. *JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*, 60(3):33–37.
- [Leroy, 2006] Leroy, C. (2006). *Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques*. PhD thesis, Docteur de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- [Liu *et al.*, 2007] Liu, Y., Li, J., Qiu, X., and Burda, C. (2007). Bactericidal activity of nitrogen-doped metal oxide nanocatalysts and the influence of bacterial extracellular polymeric substances (EPS). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 190(1):94–100.
- [Mouchet, 2000] Mouchet, P. (2000). Traitement des eaux avant utilisation : matières particulaires. *Techniques de l'ingénieur*, G1-170:4–18.
- [Panoff and Joset, 1989] Panoff, J. and Joset, F. (1989). Selection by anion-exchange chromatography of exopolysaccharide mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* strain pcc 6803. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (6):1452–1456.
- [Panoff, 1989] Panoff, J.-M. (1989). *Les exopolysaccharides de deux cyanobactéries. Synechocystis PCC6803 et 6714 : Etudes physiologiques, biochimique et génétique*. PhD thesis, Université Aix-Marseille.
- [Panoff *et al.*, 1988] Panoff, J.-M., Priem, B., Morvan, H., and Joset, F. (1988). Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714. *Arch Microbiol*, 150:558–563.
- [Phoenix *et al.*, 2002] Phoenix, V. R., Martinez, R. E., Konhauser, K. O., and Ferris, F. G. (2002). Characterization and implications of the cell surface reactivity of *Calothrix* sp. strain KC97. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (10):4827–4834.
- [Pottenger and Johnson, 1970] Pottenger, C. and Johnson, D. (1970). Mechanism of cerium (iv) oxidation of glucose and cellulose. *Journal of Polymer Science*, 8:301–318.
- [van de Meene *et al.*, 2006] van de Meene, A. M., Hohmann-Marriott, M. F., Vermaas, W. F., and Roberson, R. W. (2006). The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol*, 184:259–270.

- [Venzke, 2005] Venzke, K. (2005). *Exopolysaccharide aus Cyanobakterien-Untersuchungen zum strukturellen Aufbau und zur biologischen Aktivität*. PhD thesis, Kiel Universität.
- [Vilchez *et al.*, 2007] Vilchez, R., Pozo, C., Gomez, M. A., Rodelas, B., and Gonzalez-Lopez, J. (2007). Dominance of Sphingomonads in a copper-exposed biofilm community for groundwater treatment. *Microbiology*, 153(2):325–337.
- [Zhang *et al.*, 2004] Zhang, F., Wang, P., Koberstein, J., Khalid, S., and Chan, S. W. (2004). Cerium oxidation state in ceria nanoparticles studied with X-Ray photoelectron spectroscopy and absorption near edge spectroscopy. *Surface Science*, 563(1-3):74–82.

Résumé des principaux résultats du chapitre IV : physicochimie des interactions.

Les interactions entre NPs de CeO₂ et les cultures de Synechocystis et E. coli ont été étudiées du point de vue de la physicochimie.

- ***Floculation***

Lors d'une incubation dans l'eau en présence de NPs de CeO₂ les suspensions cellulaires de Synechocystis et E. coli flocculent. Il en est de même dans le milieu de culture MM pour Synechocystis mais pas pour E. coli dans le milieu de culture LB. La floculation est rapprochée de celle observée en présence de sels multivalents (ex : Ce³⁺) utilisée dans les procédés de dépollution. Dans des conditions environnementales, la floculation et la décantation de microorganismes photosynthétiques entraîneraient leur mort par manque de lumière.

- ***Adsorption des NPs***

La floculation est due à une adsorption des NPs à la surface des cellules. La quantité adsorbée à la surface de Synechocystis est 10 fois plus importante que celle adsorbée à la surface d'E. coli. Ceci est dû à la présence d'une couche d'exopolysaccharides (EPS) sécrétés par Synechocystis sur laquelle les NPs s'adsorbent préférentiellement.

- ***Localisation à l'échelle de la cellule***

Les NPs sont adsorbées en monocouche sur la paroi cellulaire d'E. coli contrairement à Synechocystis où elles s'adsorbent préférentiellement sur les EPS. Aucune trace de cérium n'est détectée à l'intérieur des cellules dans les deux cas.

- ***Phénomènes d'oxydoréduction***

Des analyses XPS et XANES montrent, dans l'eau, une absence de réduction des NPs induite par la présence des cellules. En revanche, les NPs semblent être partiellement réduites dans les milieux de cultures en présence de cellules. Cette réduction est attribuée au piégeage, par les NPs, des radicaux libres naturellement générés par les cellules dans leur milieu de culture et leur absence dans l'eau ultrapure à cause de la pression osmotique.

V. Différents mécanismes de toxicité

Table des matières du chapitre V : Différents mécanismes de toxicité

V.1	Toxicité liée à un contact indirect avec des nanoparticules : le cas de <i>Synechocystis</i>	215
V.1.1	Première approche sur la toxicité des nanoparticules	215
V.1.1.1	Tests de survie en milieu solide	215
V.1.1.2	Dénombrement de colonies (CFU)	219
V.1.1.3	Test d'intégrité membranaire : Live/Dead	223
V.1.2	Un mécanisme indépendant de l'effet « nano »	225
V.1.2.1	Test de la toxicité du filtrat des NPs	225
V.1.2.2	Effet de l'acide nitrique	227
V.1.3	Conclusion sur les toxicités indirectes	231
V.2	Toxicité due à un contact direct avec les nanoparticules : le cas d'<i>E. coli</i>	231
V.2.1	Augmentation de la mortalité bactérienne par contact direct avec des NPs	233
V.2.1.1	Tests de survie en milieu solide	233
V.2.1.2	Tests de dénombrement (CFU)	233
V.2.2	Mise en évidence d'interférences liées aux nanoparticules dans les tests de fluorescence	235
V.2.2.1	Test d'intégrité membranaire (LIVE/DEAD)	235
V.2.2.2	Proposition d'explication des interférences	237
V.3	Toxicité des nanoparticules : début de réponse grâce à la métabonomique.	239
V.3.1	Principe de l'étude	239
V.3.2	Analyse des résultats	243
V.3.3	Conclusion sur l'analyse métabonomique	253
V.4	Etude de l'influence des exopolysaccharides : construction de mutants.	255
V.4.1	Construction des mutants d'EPS de <i>Synechocystis</i>	255
V.4.2	Résultats	259
V.4.2.1	Caractérisation des mutants	259
V.4.2.2	Analyses des EPS	261
V.4.2.3	Floculation des mutants Δ sls5052 et Δ slr1875 en présence de nanoparticules	265
V.4.2.4	Tests Live/Dead	265
V.4.2.5	Conclusion sur les mutations réalisées	265
V.5	Matériels et méthodes	269
V.5.1	Tests de survie en milieu solide (« test en gouttes »)	269
V.5.2	Test de survie : dénombrement de colonies (CFU)	271

V.5.3	Test d'intégrité membranaire (LIVE/DEAD)	273
V.5.4	Métabonomique	275
V.5.5	Construction des mutants	279
V.5.5.1	Construction de la cassette de délétion	281
V.5.5.2	Transformation dans <i>Synechocystis</i>	285
V.5.5.3	Séquençage	285
V.5.6	Extraction et analyse des exopolysaccharides	287
V.6	Références bibliographiques	289

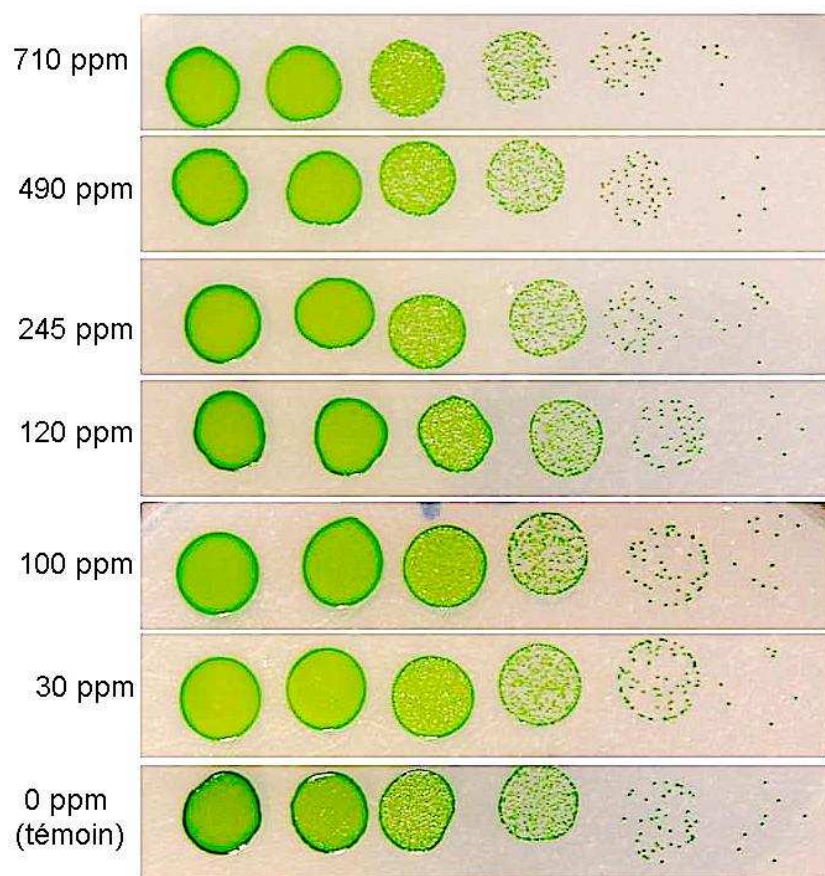


Photo 29 Test en gouttes réalisé sur *Synechocystis* en contact pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO_2 dans le milieu de culture MM.

Première goutte non diluée puis dilutions successives de 10 en 10.

V.1 Toxicité liée à un contact indirect avec des nanoparticules : le cas de *Synechocystis*

V.1.1 Première approche sur la toxicité des nanoparticules

Les différences d'interaction entre nanoparticules et bactéries ont été mises en évidence lors de tests physicochimiques. En effet, *Synechocystis*, à la différence d'*E. coli* n'est pas soumise à un contact direct avec les nanoparticules puisque celles-ci sont bloquées par la présence d'une couche dense d'exopolysaccharides se trouvant à sa surface. Les nanoparticules (chargées positivement) s'adsorbent sur les exopolysaccharides (EPS), principalement chargés négativement. Cependant, même si les nanoparticules n'atteignent pas la membrane externe de *Synechocystis* elles provoquent néanmoins une floculation bactérienne importante. La partie qui suit a pour but de tester si en l'absence d'un contact direct entre les nanoparticules et la membrane de *Synechocystis* il existe malgré tout une toxicité inhérente aux nanoparticules.

V.1.1.1 Tests de survie en milieu solide

Les cellules en croissance sont incubées avec ou sans nanoparticules dans le milieu de contact (milieu de culture ou eau ultrapure) pendant 3h avant d'être diluées successivement dans le milieu de contact puis déposées sur boîtes contenant du milieu de culture solide (voir annexe p.327). Seules les cellules vivantes sont capables de pousser et de donner des colonies observables après 15 jours pour *Synechocystis*, 1 jour pour *E. coli*. Le nombre de colonies est comparé dans différentes conditions.

- **Survie en présence de nanoparticules dans le milieu de culture MM**

En présence des nanoparticules de CeO₂ dans le milieu MM, les cultures de *Synechocystis* floculent de manière importante. De plus, les images de microscopie électronique et cartographie EDS montrent une grande quantité de nanoparticules très proches des bactéries. Logiquement, leur présence à proximité de *Synechocystis* pourrait induire des effets toxiques à « courte distance ». La Photo 29 montre le résultat d'un test d'étalement sur milieu MM solide réalisé à partir d'une culture de *Synechocystis* exposée pendant 3 h à des

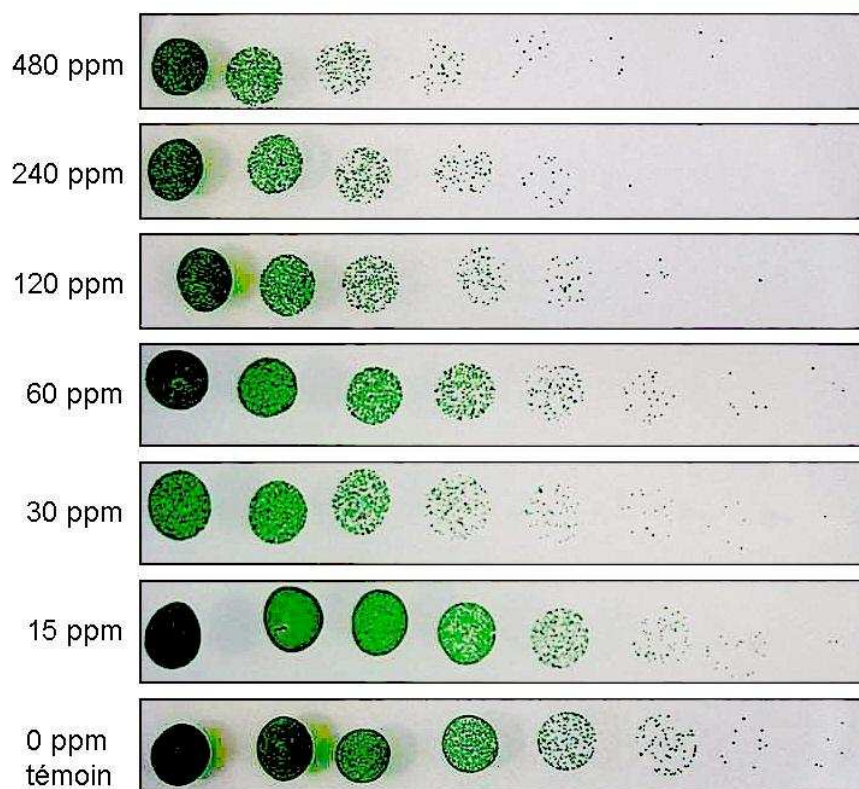


Photo 30 Test en gouttes réalisé sur des cellules de *Synechocystis* incubées pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure avant dépôt sur milieu solide. Première goutte non diluée puis dilution par 10 et dilutions suivantes de 4 en 4.

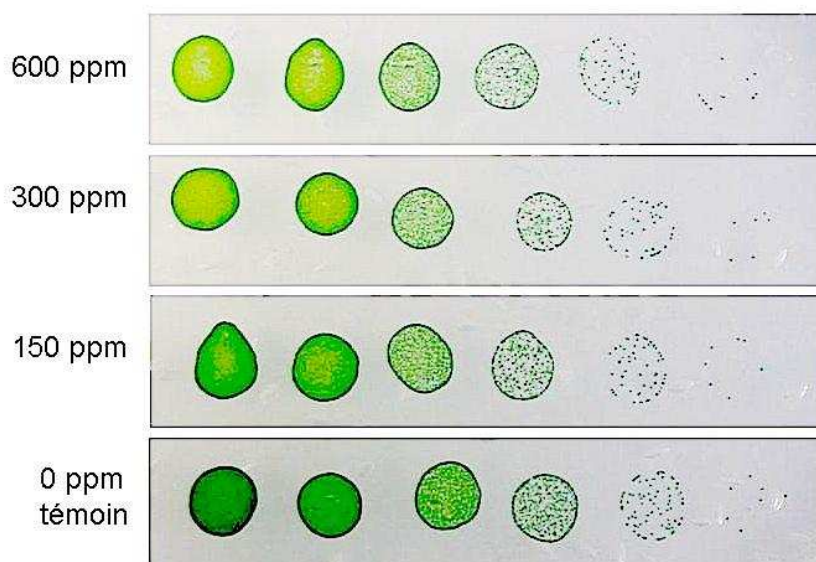


Photo 31 Test en gouttes réalisé sur des cellules de *Synechocystis* incubées pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO_2 -PAA dans l'eau ultrapure avant dépôt sur milieu solide. Première goutte non diluée puis dilutions successives de 10 en 10.

nanoparticules de CeO₂ dans le milieu de culture MM. Le test ne montre pas de différences de survie entre le témoin et toutes les concentrations inférieures ou égales à 710 ppm de CeO₂. Les NPs de CeO₂, même à des concentrations très importantes, ne sont donc pas toxiques pour *Synechocystis* lorsque le contact a lieu dans le milieu de culture (MM).

- **Survie en présence de nanoparticules dans l'eau ultrapure**

Des tests d'étalement sur milieu MM ont également été réalisés afin d'évaluer la toxicité des nanoparticules de CeO₂ sur *Synechocystis* lors d'un contact dans l'eau ultrapure. La Photo 30 présente les résultats d'un de ces tests. Les dilutions des suspensions de cellules n'ont pas été réalisées de 10 en 10 mais de 4 en 4 afin d'évaluer l'effet des nanoparticules de façon plus fine.

La survie de la culture contenant 15 ppm de CeO₂ est approximativement identique à celle du témoin. Les cultures contenant 30 et 60 ppm de CeO₂ montrent des survies réduites d'environ un quart par rapport au témoin. En effet, il y a un décalage d'une dilution pour ces deux cultures, donc environ 25 % de survie par rapport au témoin. Pour les concentrations supérieures à 60 ppm, les dilutions sont décalées d'environ deux par rapport au témoin, c'est-à-dire d'un facteur 16. Les survies ne dépassent donc pas 6 % pour ces concentrations élevées.

- **Survie en présence de nanoparticules fonctionnalisées (CeO₂-PAA) dans l'eau ultrapure**

Les charges de surface positives des nanoparticules de CeO₂ étant à l'origine de la forte adsorption des nanoparticules sur les cellules (ou leurs exopolysaccharides), nous avons étudié l'influence de la charge de surface des NPs en testant également la toxicité de nanoparticules de CeO₂ chargées négativement. Nous avons utilisé pour cela des NPs de CeO₂ stabilisées par de l'acide polyacrylique. Ces nanoparticules sont très stables dans différents milieux et ont été obtenues par la méthode décrite par Sehgal *et al.*, 2005. Nous n'avons observé aucune floculation cellulaire lors de la réalisation que ce soit dans le milieu de culture MM ou dans l'eau ultrapure. Les tests de survie sur milieu solide montrent qu'il n'y a aucun impact des nanoparticules de CeO₂-PAA sur la survie de *Synechocystis* que ce soit dans l'eau ou dans le MM pendant 3 h ou 24 h (exemple de l'incubation dans l'eau ultrapure présenté Photo 31).

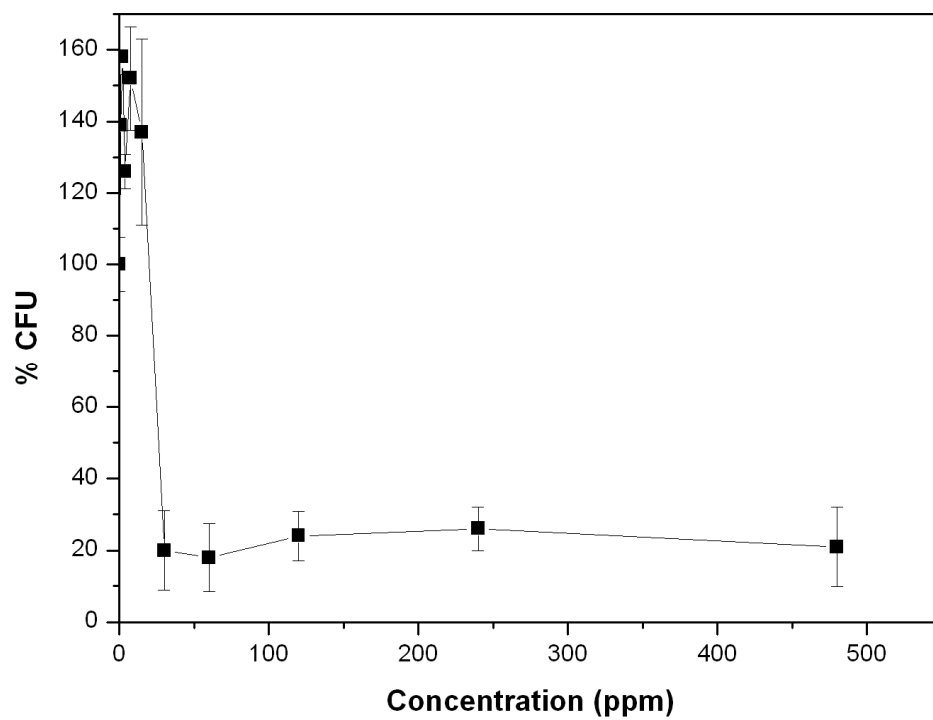


Figure 34 Test de survie (CFU) de *Synechocystis* en contact pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure.

L'acide polyacrylique a également été testé dans les mêmes conditions et à des concentrations équivalentes et n'a montré aucune toxicité. Les cultures ne flocculent pas en présence des NPs CeO₂-PAA, ce qui est en accord avec une répulsion électrostatique due à la présence de charges de surface négatives à la fois sur les cellules et sur les NPs. Des photographies en microscopie optique de ces cultures en présence d'encre de Chine révèlent de plus une augmentation notable de la couronne transparente autour des cellules lorsque celles-ci sont incubées en présence de ces nanoparticules (voir annexe p. 317 pour illustration). Ceci confirmerait une augmentation de la répulsion électrostatique des EPS vis-à-vis de l'encre de Chine par interactions avec des NPs également chargées négativement.

V.1.1.2 Dénombrement de colonies (CFU)

- **Survie en présence de nanoparticules dans l'eau ultrapure**

Les tests en gouttes réalisés sur *Synechocystis* dans l'eau ultrapure en présence de nanoparticules montrent une diminution de la survie pour des concentrations supérieures à 30 ppm de CeO₂. Des tests de survie par la technique de dénombrement de colonies (CFU) ont été réalisés afin de quantifier plus précisément cette baisse (voir annexe p.328). Ces tests ont été reproduits trois fois minimum et ont donné des résultats identiques, la Figure 34 présente les résultats obtenus pour l'un d'entre eux, les barres d'erreur correspondent aux écarts-types entre les colonies dénombrées sur les 3 à 6 boîtes répétées pour chaque condition.

Les concentrations en CeO₂ supérieures ou égales à 30 ppm provoquent une baisse très importante de la survie de *Synechocystis*. En effet, la survie est marquée par une diminution rapide entre 15 et 30 ppm de CeO₂ (baisse de 140 % à 20 %). Puis, de façon assez surprenante, quelque soit la quantité de nanoparticules ajoutées pour des concentrations supérieures à 30 ppm, la survie atteint un plateau à 20 %.

De plus, les survies pour les petites quantités de nanoparticules sont très supérieures à 100 % ce qui est également assez surprenant. Plusieurs explications peuvent être à l'origine de ce phénomène. Tout d'abord, les cultures de *Synechocystis* étant utilisées en phase exponentielle, les bactéries sont majoritairement en division et se présentent sous forme de doublets. Il est possible que la présence des nanoparticules aux niveaux des plans de division cellulaires accélère la division provoquant ainsi une augmentation de la quantité de cellules simples par rapport aux cellules en doublet. Comme une colonie peut aussi bien provenir d'une cellule

simple que d'un doublet, cet effet d'accélération de la division provoquée par les faibles doses de NPs entrainerait ainsi une augmentation apparente de la survie. Ainsi les 140 % de survie observés correspondraient à une population initiale contenant 50 % de bactéries en cours de division et dont aucune ne serait tuée par les faibles doses de NPs. Par dénombrement en microscopie électronique, nous avons comparé le nombre de singulets et doublets dans une culture contenant des nanoparticules de CeO_2 en faible concentration (1 ppm) à ceux d'une culture témoin. Lors de ce test, 8 % des bactéries étaient sous forme de doublets après une mise en contact avec les nanoparticules contre 18 % dans l'échantillon témoin. Les pourcentages obtenus sont cependant trop élevés pour que l'accélération de la division cellulaire soit l'unique explication. Il est également possible que, lorsque les concentrations en nanoparticules sont suffisamment faibles pour ne pas avoir d'effet toxique sur les cellules, la présence des ions (Ce^{3+} et HNO_3) apportés par les solutions de nanoparticules contribue à l'amélioration des conditions de survie des cellules dans un environnement très appauvri en sels (eau ultrapure). Les survies étant calculées par rapport au témoin en absence de sels, celles-ci sont de ce fait artificiellement augmentées. De plus, cette constatation d'une augmentation de la survie aux faibles doses de NPs a également été notée par Reddy *et al.*, 2007 et Brayner *et al.*, 2006 dans le cas d'*E. coli* incubée en présence de nanoparticules de ZnO .

- **Impact de la floculation sur les tests de dénombrement de colonies (CFU)**

La survie de *Synechocystis* en présence de nanoparticules dans l'eau ultrapure varie de façon importante pour des concentrations en CeO_2 comprises entre 15 et 30 ppm, puis atteint un plateau à 20 % de survie et reste identique pour des concentrations plus importantes. Il est surprenant que quelque soit la quantité de nanoparticules ajoutée la survie reste identique. Or cette gamme de concentrations correspond aux concentrations où la culture est dans un état floculé.

La floculation des bactéries lors des tests de survie par comptage de colonies n'est pas à notre connaissance un phénomène fréquemment mentionné. Cependant cette floculation peut avoir un impact non négligeable lors de l'interprétation de ces tests. En effet, les tests CFU sont basés sur le fait qu'une cellule individualisée est à l'origine d'une colonie, ces tests sont donc faussés dans le cas où plusieurs cellules agrégées entre elles sont à l'origine d'une colonie unique.

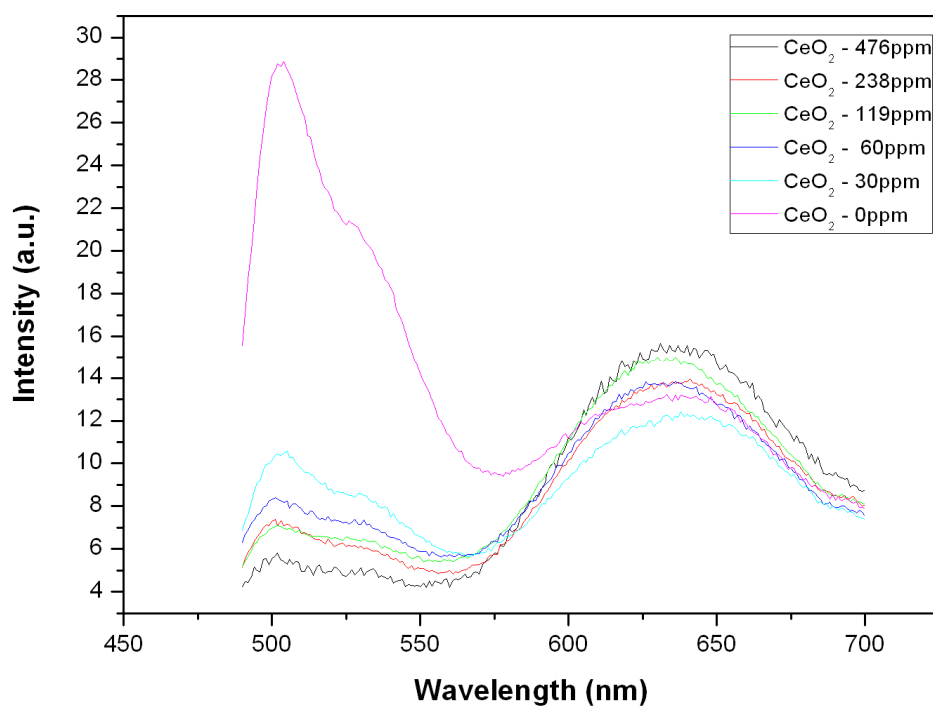


Figure 35 Test LIVE/DEAD réalisé sur une suspension cellulaire de *Synechocystis* ayant incubé pendant 3h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure. Mesures réalisées dans des cuves de spectroscopie par scan des longueurs d'ondes de fluorescence entre 470 et 700 nm et pour 6 concentrations en NPs différentes (de 0 à 476 ppm).

Par exemple, un traitement qui entraînerait une agrégation « moyenne » en amas de 5 cellules conduirait à une survie apparente de 20 %. Les observations de ces cellules en microscopie optique montrent cependant des agrégats de tailles très hétérogènes ce qui ne correspond pas à la présence d'un plateau net à 20 % de survie. Il est cependant possible que les multiples étapes d'homogénéisation (nombreux vortexages et pipetages) réalisées de façon identique ne conduisent pas à une désagrégation complète des floccs de bactéries mais à leur cisaillement en floccs de tailles moyennes identiques et reproductibles. On ne peut donc pas pleinement conclure à ce stade quant à l'influence de la floculation sur le taux de comptage des colonies. Nous avons donc utilisé une autre technique qui permet de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes par des mesures en fluorescence moins sensibles aux phénomènes de floculation.

V.1.1.3 Test d'intégrité membranaire : Live/Dead

- **Test d'intégrité membranaire en présence de nanoparticules dans l'eau ultrapure**

Contrairement aux tests de survie sur boîtes, les tests d'intégrité membranaires ne donnent pas d'indication sur la capacité des cellules à se diviser mais ils renseignent sur leur état morphologique. Ces tests sont basés sur la pénétration sélective de marqueurs fluorescents à l'intérieur des cellules. Certains marqueurs rentrent dans toutes les cellules (quelque soit l'état de leur membrane), d'autres ne pénètrent que dans celles dont la membrane cellulaire a été altérée. La différence de fluorescence entre les deux marqueurs permet d'en déduire le pourcentage de bactéries vivantes par rapport aux nombres de cellules totales.

Le test LIVE/DEAD (voir annexe p. 329) a également été testé en présence de suspensions de nanoparticules seules (pour des concentrations variant de 0,15 à 10 g/L) afin de vérifier la présence éventuelle d'interférences entre les nanoparticules et les colorants fluorescents (Worle-Knirsch *et al.*, 2006). Les intensités de fluorescence mesurées sont de l'ordre du bruit de fond. Il n'y a donc aucune interférence entre les colorants fluorescents utilisés et les nanoparticules de CeO₂.

La Figure 35 présente les scans de fluorescence réalisés sur une culture de *Synechocystis* en présence de nanoparticules de CeO₂ pendant 3h dans l'eau ultrapure et soumise au test LIVE/DEAD. Ces spectres ont la forme classique des spectres présentés en exemple dans le protocole LIVE/DEAD Invitrogène. Les spectres de fluorescence présentent deux maxima pour 505 et 635 nm. Le premier maximum correspond à la fluorescence du SYTO 9, qui marque toutes les bactéries, et le deuxième à la fluorescence de l'iodure de propidium, qui ne

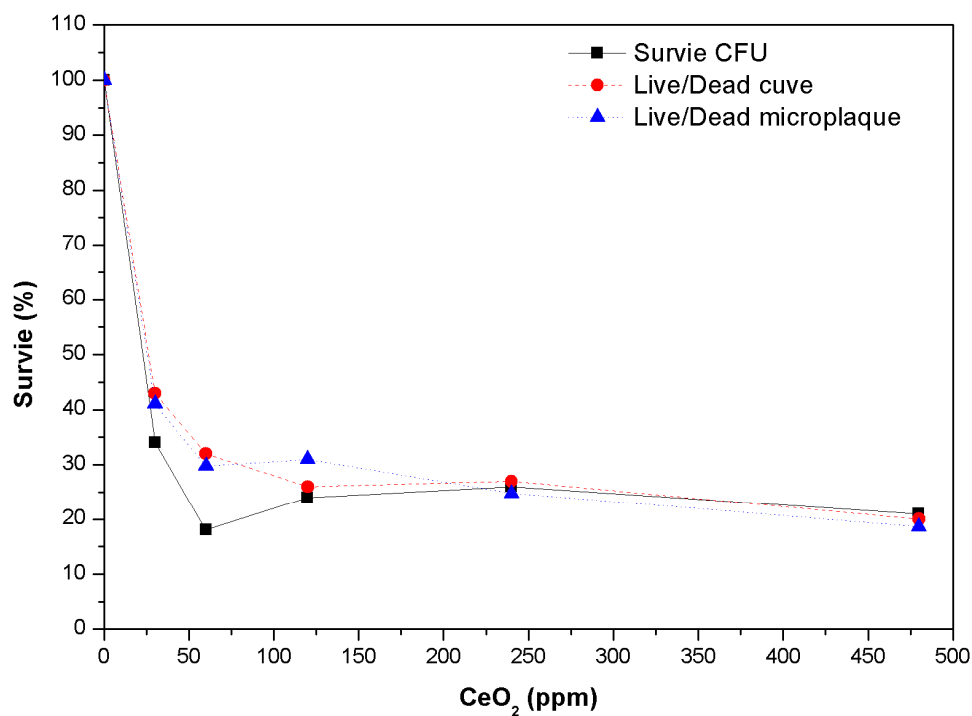


Figure 36 Survie CFU et Live/Dead d'une suspension cellulaire de *Synechocystis* en contact pendant 3 h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 . Comparaison des résultats obtenus pour des tests LIVE/DEAD (mesures en cuve et mesures en microplaques multipuits) et un test CFU.

pénètre que dans les bactéries aux parois endommagées mais dont la fluorescence occulte celle du SYTO 9. Le témoin (sans nanoparticule) donne un signal particulièrement important (30 unités arbitraires) au maximum de fluorescence du SYTO 9 mais un signal moyen pour la fluorescence correspondant à l'iodure de propidium (13 u.a.). Lorsque la concentration en nanoparticules augmente, le pic de fluorescence à 505 nm diminue tandis que le pic à 630 nm augmente (mais dans une proportion moindre) .

- **Comparaison avec la méthode CFU et conclusion sur les artefacts**

Les résultats obtenus avec la méthode LIVE/DEAD sont comparés à ceux obtenus par la méthode du test de survie CFU (Figure 36). Les résultats sont superposables pour les deux tests (CFU et LIVE/DEAD cuve), excepté pour la concentration à 60 ppm qui correspond à la zone très floculée), Cependant le test Live/Dead nécessite un transvasement entre les tubes où les cultures sont incubées en présence de nanoparticules et les cuves de spectroscopie servant aux mesures de fluorescence. Afin de l'éviter nous avons eu recours aux plaques multipuits. Ces dernières nous ont permis de réaliser l'incubation et la mesure dans la même plaque sans étape de transfert. Les résultats obtenus en microplaques sont identiques à ceux obtenus par les deux autres méthodes.

La méthode LIVE/DEAD confirme ainsi les résultats obtenus lors des tests de survie en CFU : une chute brutale puis un plateau à 20 % de survie. Ces deux méthodes étant complètement indépendantes, elles montrent donc le réel taux de survie de *Synechocystis* en présence des nanoparticules et non un artefact uniquement dû à la floculation. Une fraction (20 %) de la population de *Synechocystis* semble donc être résistante aux nanoparticules.

V.1.2 Un mécanisme indépendant de l'effet « nano »

V.1.2.1 Test de la toxicité du filtrat des NPs

Les solutions de nanoparticules ont un effet toxique sur *Synechocystis* et ce malgré un contact direct très limité avec la membrane cellulaire. Plusieurs mécanismes de toxicité à distance peuvent être envisagés. On peut tout d'abord supposer des phénomènes d'oxydoréduction entre les nanoparticules et les EPS.

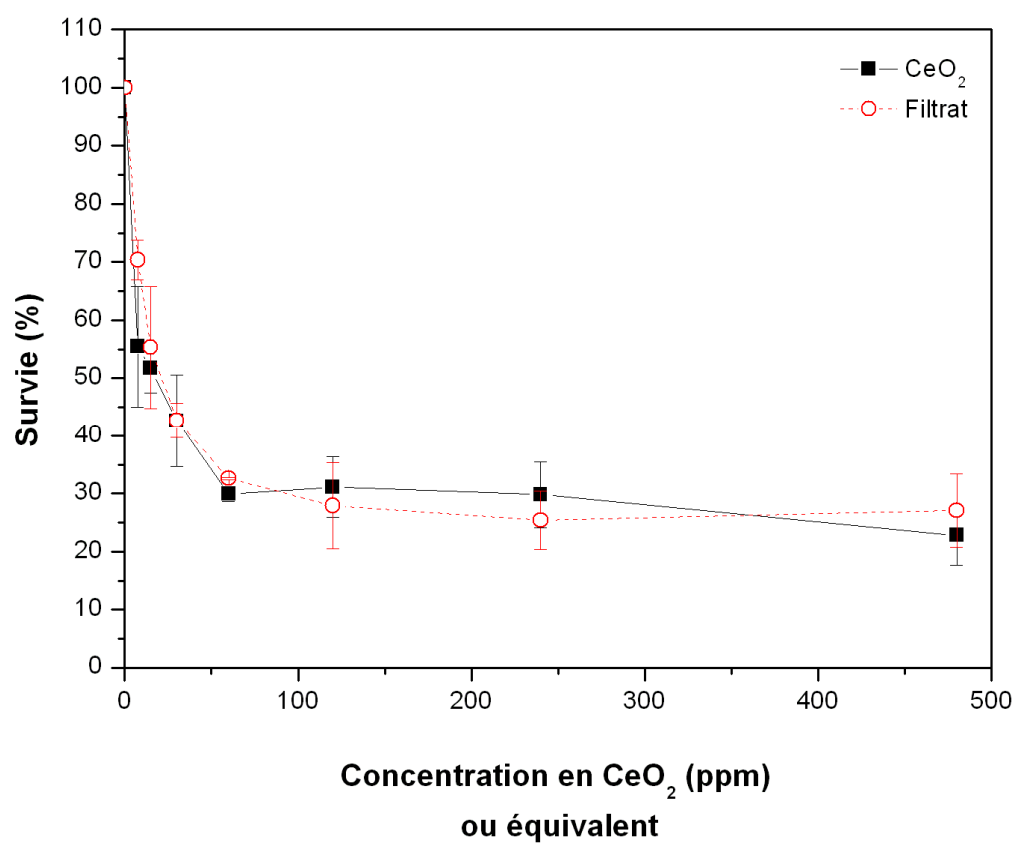


Figure 37 Survie d'une culture de *Synechocystis* pendant 3 h dans l'eau ultrapure (test LIVE/DEAD). Comparaison entre l'impact d'une incubation avec des nanoparticules de CeO_2 et d'une incubation avec leur filtrat (sans nanoparticules).

Le cérium IV a en effet déjà été utilisé comme activateur redox dans des réactions de polymérisation car il peut former des complexes radicalaires avec les polysaccharides (Chauvierre *et al.*, 2003). Des espèces radicalaires provenant des nanoparticules seraient libérées dans le milieu (ici l'eau) et interagiraient avec les lipopolysaccharides de la membrane de *Synechocystis* pour y créer des altérations létales. Cependant les expériences d'oxydoréduction présentées dans le chapitre IV-3, n'ont pas montré de réduction marquée des nanoparticules lorsque celles-ci sont dans l'eau en présence de cellules de *Synechocystis*. Cette hypothèse n'est donc a priori pas validée.

Une autre hypothèse est que le filtrat des nanoparticules, et non les nanoparticules elles-mêmes, est à l'origine de la toxicité observée. En effet, cette toxicité pourrait venir des constituants de l'environnement des nanoparticules : ions en solution (Ce^{3+} , HNO_3), solvant, tensioactifs ou polymères utilisés pour stabiliser les nanoparticules. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons testé l'effet du filtrat des nanoparticules (sans les nanoparticules) sur une culture de *Synechocystis* dans l'eau ultrapure. La Figure 37 présente deux tests de survie de *Synechocystis* dans l'eau, l'un a été réalisé avec les solutions de nanoparticules de CeO_2 , l'autre avec le filtrat correspondant à ces solutions de nanoparticules. Le filtrat a été obtenu par ultrafiltration de la solution mère de nanoparticules mère (10 g/L) dans une cellule Hamicon sur une membrane de cellulose régénérée (10 kDa). Les survies bactériennes obtenues grâce au test LIVE/DEAD sont identiques en présence d'une solution de nanoparticules ou simplement en présence du filtrat de ces nanoparticules. Il y a donc une absence de toxicité intrinsèque des nanoparticules de CeO_2 vis à vis de *Synechocystis*.

V.1.2.2 Effet de l'acide nitrique

Ainsi la toxicité est uniquement imputable au filtrat des NPs. Il faut donc identifier le mécanisme responsable de cette toxicité. Les nanoparticules de CeO_2 ont été choisies dans cette étude pour leur bon maintien en suspension dans l'eau sans ajout de tensioactifs ni polymères. Les espèces présentes en solution sont donc limitées aux ions Ce^{3+} et à l'acide nitrique présent dans la synthèse des nanoparticules. Les expériences de dissolution (Partie II) ayant montré une dissolution très lente des nanoparticules, la quantité maximale de cérium ionique en solution après 3 h d'incubation est probablement peu supérieure à 5 % de la concentration totale de cérium ce qui est insuffisant pour provoquer une telle chute de survie. L'acide nitrique résiduel à la synthèse est donc le toxique le plus vraisemblablement à l'origine de la mortalité observée.

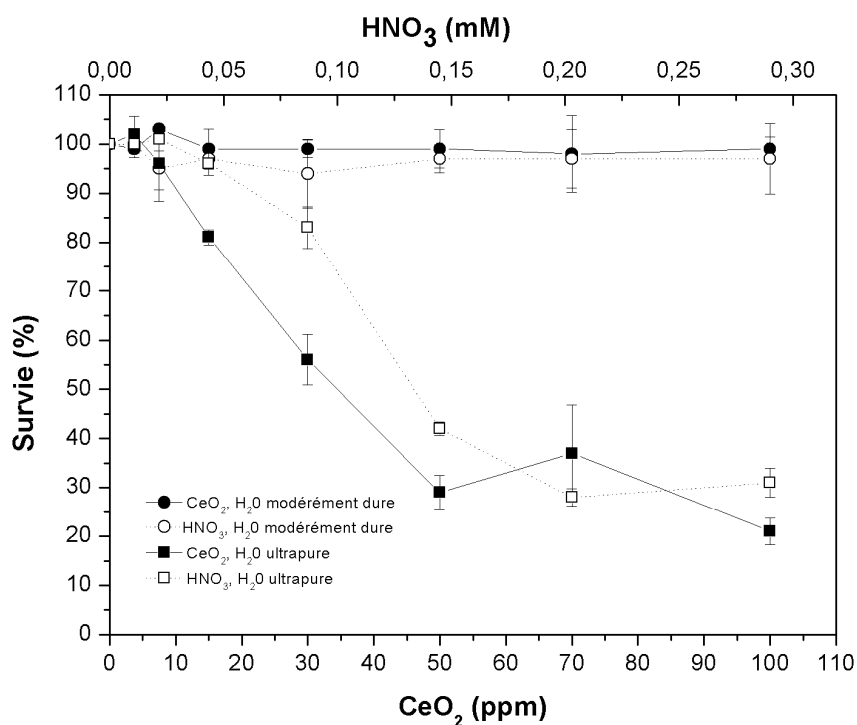


Figure 38 Comparaison entre les tests de survie LIVE/DEAD réalisés sur *Synechocystis* dans l'eau ultrapure (symboles carrés) et l'eau synthétique modérément dure (symboles ronds) en présence pendant 3 h de nanoparticules de CeO_2 (symboles pleins) ou de leur équivalent en concentration d'acide nitrique (symboles vides).

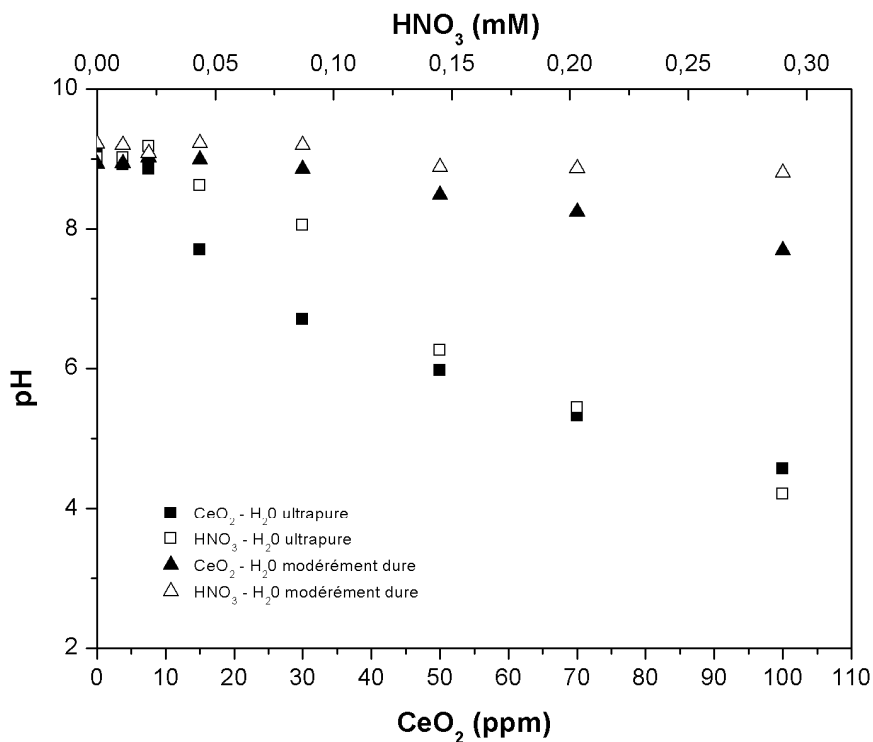


Figure 39 Mesures de pH de cultures de *Synechocystis* mises en contact avec des nanoparticules de CeO_2 (symboles pleins) ou de l'acide nitrique (symboles vides) dans l'eau ultrapure (Carrés) ou dans l'eau synthétique (triangles).

- **Live/dead eau ultrapure et eau modérément dure**

La Figure 38 compare la survie de *Synechocystis* en présence de nanoparticules de CeO_2 à celle en présence d'acide nitrique dans l'eau ultrapure et dans l'eau synthétique modérément dure.

L'eau synthétique a été choisie car sa force ionique est à la fois suffisamment faible pour éviter les phénomènes d'aggrégation des nanoparticules (ceci a été vérifié en DLS) mais suffisamment différente de celle de l'eau ultrapure pour réaliser des tests de survie dans des conditions moins défavorables aux cellules. Nous avons de plus concentré les mesures sur la zone de concentrations inférieures à 100 ppm de CeO_2 afin d'étudier plus en détails la chute de la survie avant le plateau qui apparaît à partir de 60 ppm sur la Figure 37.

La toxicité induite par les solutions de nanoparticules concorde avec celle provoquée par un ajout équivalent d'acide nitrique. Le taux de survie décroît de 0 à 40 ppm de CeO_2 (ou 0,15 mM d'acide nitrique) puis atteint un plateau vers 20 et 30 % de survie pour les concentrations supérieures à 50 ppm de CeO_2 . En revanche, l'ajout de nanoparticules ou d'acide nitrique n'affecte pas la survie dans l'eau synthétique. Afin de comprendre ce phénomène, le pH des cultures de *Synechocystis* en contact avec des nanoparticules ou de l'acide nitrique dans l'eau ultrapure et dans l'eau synthétique a été mesuré.

- **pH**

Les résultats de ces mesures de pH (Figure 39) montrent une forte influence des nanoparticules et de l'acide nitrique sur le pH des cultures dans l'eau ultrapure. On remarque que le pH est supérieur à 7 dans l'eau (ultrapure et modérément dure) ceci est dû à une basification du milieu par les cellules de *Synechocystis*, en effet, la mesure de pH a été réalisée environ 30 min après que les cellules aient été lavées dans l'eau. Le pH diminue de 9 à 4 pour 100 ppm de CeO_2 ajoutés ainsi que pour son équivalent en acide nitrique. Les mesures dans l'eau synthétique modérément dure ne montrent en revanche quasiment aucune variation de pH lors de l'ajout des nanoparticules ou de l'acide nitrique.

La composition de l'eau synthétique modérément dure est probablement à l'origine de ce phénomène. En effet, celle-ci contient de l'hydrogénocarbonate de sodium (ou bicarbonate de soude, NaHCO_3) qui se comporte comme un agent tampon lorsque mis en présence de petites quantités d'acide (couple mis en jeu : $\text{NaH}_2\text{CO}_3^+ / \text{NaHCO}_3$) ou de base (couple mis en jeu : $\text{NaHCO}_3 / \text{NaCO}_3^-$). Ceci explique pourquoi il n'y a aucune modification importante du pH jusqu'à 100 ppm de nanoparticules dans l'eau synthétique. Les ions nitrates étant présents en

concentration importante dans le milieu MM, les toxicités observées en présence de nanoparticules ou de leur équivalent en acide nitrique sont donc directement liées aux différences d'acidification des cultures cellulaires.

V.1.3 Conclusion sur les toxicités indirectes

La présence de nanoparticules de CeO₂ dans le milieu de culture MM ou dans l'eau synthétique modérément dure n'induit aucun impact sur la survie des cellules. En revanche, dans l'eau ultrapure, leur présence provoque une baisse très importante de la survie des bactéries. Malgré l'importante absorption des nanoparticules de CeO₂ sur les EPS de *Synechocystis*, leur contact direct avec la membrane cellulaire est très limité. Les mécanismes de toxicité observés ne sont donc pas liés à un effet direct de la présence de nanoparticules mais de l'acide nitrique apporté lors de la préparation des dispersions de nanoparticules (acide initialement présent dans la poudre). Le plateau de survie à 20 % met en évidence la présence d'une sous-population de cellules résistante aux pH acides.

Dans les milieux tamponnés tel que le milieu MM ou « semi-tamponnés » comme l'eau synthétique, les variations de pH sont très limitées et les cellules sont, de ce fait, protégées des effets de l'acide nitrique. Les nanoparticules de CeO₂ fonctionnalisées avec de l'acide polyacrylique ne montrent par ailleurs aucune toxicité chez *Synechocystis* dans l'eau ultrapure. Ceci apporte un argument supplémentaire à l'absence d'effet « nano » pour ce modèle biologique. La toxicité des solutions de nanoparticules de CeO₂ est donc bien réelle chez *Synechocystis* mais uniquement due à la présence d'acide nitrique lors de la préparation des nanoparticules. L'utilisation d'un milieu contenant un agent tamponnant, même en faible concentration, a suffi à limiter cette toxicité.

V.2 Toxicité due à un contact direct avec les nanoparticules : le cas d'*E. coli*

Contrairement au cas de *Synechocystis*, les nanoparticules entrent en contact direct avec la membrane cellulaire d'*E. coli*. La partie suivante est consacrée à l'étude des effets de ce contact direct sur la survie des bactéries.

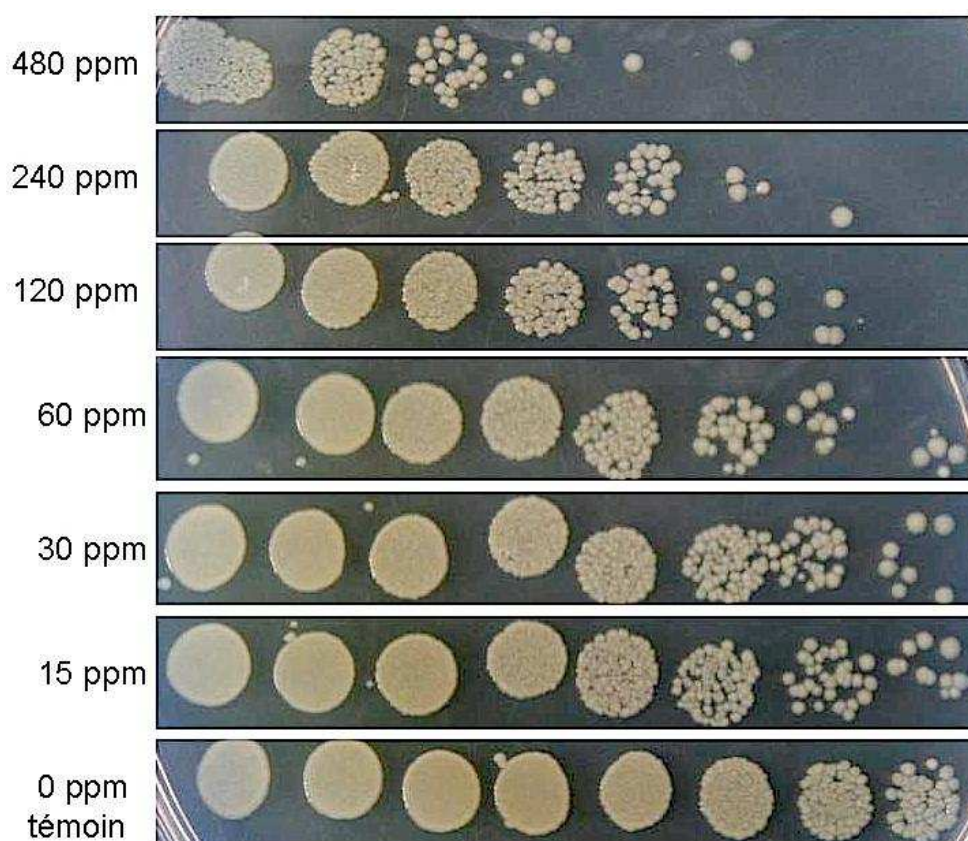


Photo 32 Test en gouttes réalisé sur *E. coli* en contact pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure. Dilutions réalisées de 4 en 4.

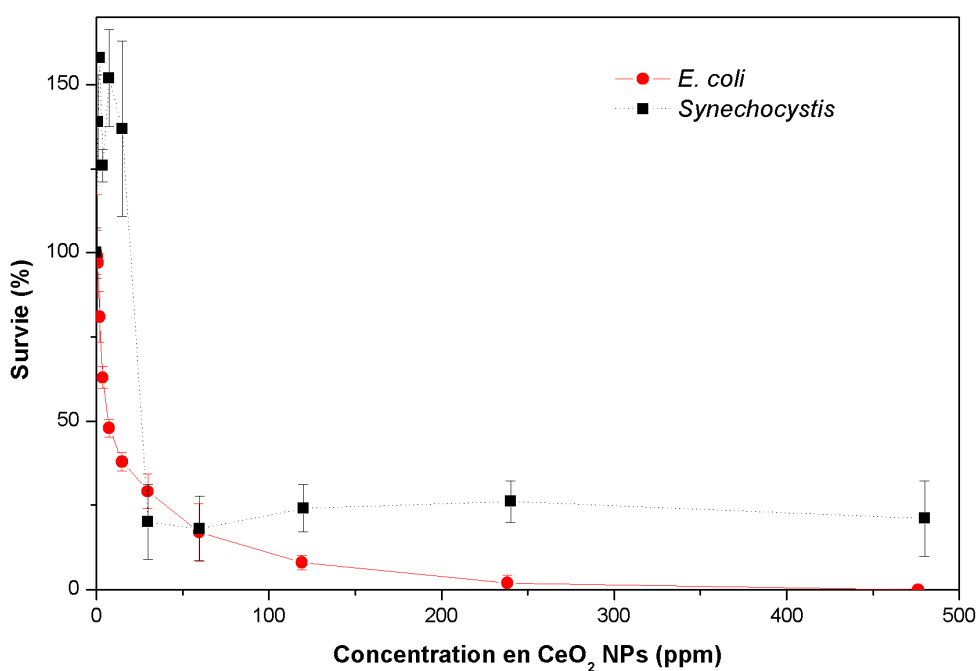


Figure 40 Tests de survie (CFU) d'*E. coli* et *Synechocystis* en contact pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure.

V.2.1 Augmentation de la mortalité bactérienne par contact direct avec des NPs

V.2.1.1 Tests de survie en milieu solide

- **Survie en présence de nanoparticules dans le milieu de culture LB**

Les tests de survie réalisés sur *E. coli* dans son milieu de culture LB ne montrent aucune mortalité liée à la présence des nanoparticules. Il est probable que les molécules organiques présentes dans le milieu LB recouvrent les nanoparticules de cérium. Ce phénomène a pour effet de passiver les charges de surface des nanoparticules et d'éviter leur adsorption à la surface des bactéries.

- **Survie en présence de nanoparticules dans l'eau ultrapure**

Les tests de survie ont également été réalisés dans l'eau ultrapure en présence de nanoparticules. Contrairement aux tests réalisés dans le milieu de culture, ils montrent un impact important des nanoparticules sur la survie d'*E. coli* (Photo 32). En effet, dès 15 ppm de CeO₂ il y a un décalage de deux dilutions par rapport au témoin puis de nouveau un décalage d'une dilution entre la concentration 30 ppm et 60 ppm, et de même pour chaque augmentation de concentration jusqu'à 480 ppm de CeO₂. Les suspensions de nanoparticules ont donc un effet toxique marqué sur *E. coli* même à la faible dose de 15 ppm de CeO₂.

V.2.1.2 Tests de dénombrement (CFU)

Les tests de survie en milieu solide en gouttes mettent en évidence une toxicité importante des nanoparticules de CeO₂ sur *E. coli* lors d'un contact dans l'eau ultrapure. Des tests CFU réalisés dans les mêmes conditions (Figure 40) montrent une chute de la survie d'*E. coli* dès les plus faibles concentrations de nanoparticules. La LD50 (dose létale pour 50 % d'une population) est atteinte dès 7 ppm de CeO₂. Pour toutes les concentrations supérieures à 100 ppm, la mortalité est supérieure à 95 %. Ces premières observations confirment une toxicité importante des nanoparticules de CeO₂ pour *E. coli* dans l'eau ultrapure, mais à la différence de *Synechocystis*, la mortalité est totale pour les concentrations les plus importantes en nanoparticules. Ceci confirme de nouveau que les 20 % de survie observés chez *Synechocystis* aux fortes doses de NPs résultent bien de l'existence d'une sous-population de cellules

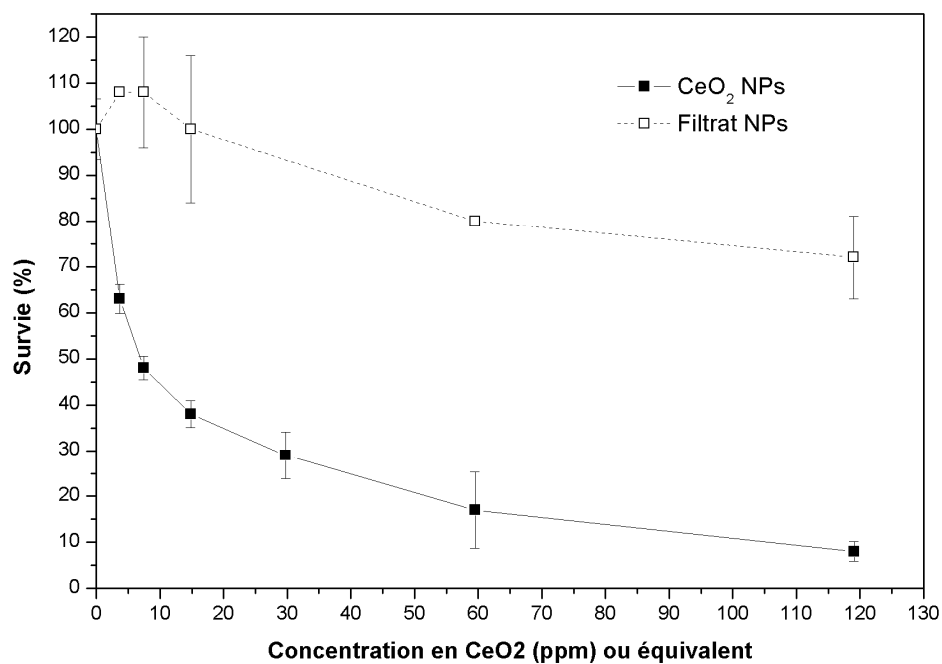


Figure 41 Comparaison de la survie d'*E. coli* (tests CFU dans l'eau ultrapure) après 3 h d'incubation avec des nanoparticules de CeO₂ à une incubation avec le filtrat de ces nanoparticules.

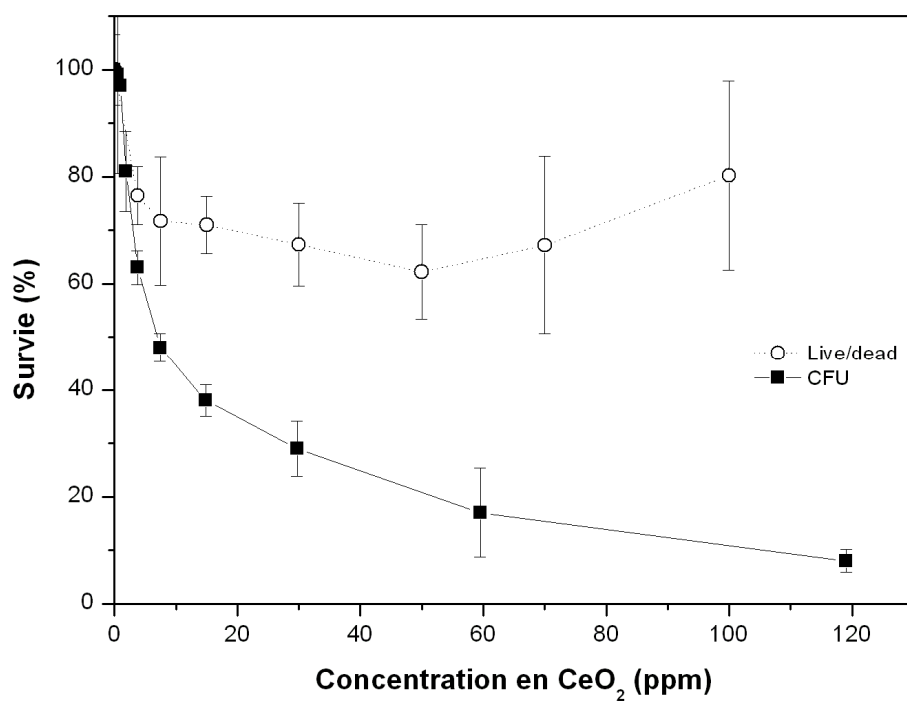


Figure 42 Survie d'une culture d'*E. coli* en contact pendant 3 h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO₂. Comparaison des résultats obtenus pour un test LIVE/DEAD et un test CFU.

résistantes et non pas d'un artefact physico-chimique indépendant de la nature du microorganisme étudié.

- **Comparaison de la mortalité due aux NPs avec celle due à leur filtrat et au pH**

Comme dans le cas des cellules de *Synechocystis*, nous avons vérifié l'influence de la toxicité du filtrat des nanoparticules sur *E. coli*. L'acide nitrique est connu pour être à l'origine d'effets mutagènes chez *E. coli* (Kaudewitz, 1963). Les concentrations d'acide nitrique testées par ces auteurs étaient cependant nettement plus importantes (17 mM) que dans notre étude (0,4 mM). La Figure 41 compare la toxicité du filtrat à celle provoquée par la suspension de nanoparticules. Le filtrat des nanoparticules provoque effectivement une chute de la survie d'*E. coli*, mais contrairement à *Synechocystis*, cette toxicité n'est pas l'unique cause de la mortalité observée lors des tests avec les nanoparticules. En effet, pour des concentrations équivalentes à 120 ppm de nanoparticules, la survie baisse jusqu'à 70 % en présence du filtrat alors qu'elle atteint 5 % lorsque les nanoparticules sont également présentes. La toxicité de l'acide nitrique est loin d'être aussi marquée pour *E. coli*, cela est sans doute à relier à la capacité de cette bactérie de survivre dans des conditions très acides (notamment dans l'estomac) (Foster, 2004). Ce résultat diffère de celui observé chez *Synechocystis* où le contact direct entre nanoparticules et membrane cellulaire est limité et où l'intégralité de la toxicité est attribuée à la présence d'acide nitrique. Chez *E. coli* en revanche, la toxicité des nanoparticules résulte de deux phénomènes : pH (mais effet limité) et un contact direct avec la paroi cellulaire qui peut interférer avec l'import des nutriments dans la cellule et/ou l'excrétion de substances toxiques. Les nanoparticules sont donc directement toxiques pour *E. coli*.

V.2.2 Mise en évidence d'interférences liées aux nanoparticules dans les tests de fluorescence

V.2.2.1 Test d'intégrité membranaire (LIVE/DEAD)

- **Comparaison des tests CFU avec les tests de fluorescence**

Le test de fluorescence LIVE/DEAD a été utilisé afin d'évaluer l'intégrité membranaire d'*E. coli* après un contact avec les nanoparticules. Les résultats obtenus par les deux méthodes (CFU et LIVE/DEAD) sont comparés Figure 42. Contrairement au cas de *Synechocystis*, les résultats obtenus avec la méthode LIVE/DEAD et ceux obtenus lors de tests de CFU

classiques sont loin d'être comparables. Si les premiers points indiquent effectivement une baisse de la survie pour les faibles concentrations en nanoparticules, dès 15 ppm la survie est beaucoup plus importante que lors des tests CFU classiques. Pour plus de 60 ppm de CeO₂ la survie réaugmente progressivement mais avec des écarts de répétabilité sur la mesure de plus en plus importantes (jusqu'à 40 %). Ces tests ont été reproduits plus de 3 fois avec le même résultat. Le test LIVE/DEAD n'est donc pas adapté à l'étude de la toxicité des nanoparticules de CeO₂ sur *E. coli*.

V.2.2.2 Proposition d'explication des interférences

Les résultats étonnants obtenus lors des tests LIVE/DEAD sur *E. coli* en contact avec les nanoparticules de CeO₂ ne peuvent pas être dus à des interactions directes entre nanoparticules et marqueurs fluorescents (point déjà discuté partie V.1.1.3). En revanche, il peut exister des interactions indirectes lorsque les bactéries sont également présentes lors de la mesure. En effet, pour des concentrations en CeO₂ supérieures à 15 ppm, les résultats obtenus en LIVE/DEAD ne correspondent plus à ceux des tests CFU. Or à partir de cette concentration l'isotherme d'adsorption des nanoparticules sur *E. coli* atteint un plateau. Les nanoparticules forment une couche dense (proche de la monocouche) à la surface d'*E. coli*. Cette « coque », chargée positivement constitue une barrière électrostatique face aux marqueurs fluorescents utilisés lors du test LIVE/DEAD. En effet, ces derniers étant des marqueurs de l'ADN (chargé négativement), ils sont électropositifs et ainsi repoussés par la présence des nanoparticules à la surface des bactéries. Cette répulsion expliquerait l'entrée aléatoire des marqueurs fluorescents à l'intérieur des bactéries et met en doute la fiabilité de ce test dans le cas de ce modèle bactérien. A contrario dans le cas de *Synechocystis*, les nanoparticules ne formant pas de couche uniforme à la surface de la cellule, les colorants du Live/Dead peuvent franchir librement la paroi cellulaire. C'est pourquoi les résultats obtenus avec les tests Live/Dead et les tests CFU sont identiques dans ce cas.

En conclusion, si les nanoparticules utilisées ne montrent aucune interférence directe avec les marqueurs de ce test fluorescent, elles sont cependant à l'origine d'une interférence indirecte ayant un fort impact sur la fiabilité des résultats.

V.3 Toxicité des nanoparticules : début de réponse grâce à la métabonomique.

Les nanoparticules présentent une toxicité plus importante que leur filtrat lors d'une incubation dans l'eau avec *E.coli*. Afin de comprendre en quoi réside cette différence de toxicité, nous avons utilisé la métabonomique qui est basée sur l'analyse des métabolites.

V.3.1 Principe de l'étude

- **Analyse métabonomique**

Les métabolites sont l'ensemble des molécules impliquées dans les transformations moléculaires et les transferts d'énergie de la cellule. Il existe des centaines de métabolites spécifiques de chaque type cellulaire. Ils constituent l'empreinte de l'activité de la cellule, et leur variation reflète ainsi les perturbations biochimiques qu'elle subit, notamment en présence d'un toxique.

Il existe différentes méthodes pour analyser les métabolites d'une cellule, on trouve notamment la spectrométrie de masse, éventuellement couplée à de la chromatographie, ainsi que la résonance magnétique nucléaire (RMN). C'est cette dernière qui a été utilisée dans cette étude car elle possède deux avantages principaux. Premièrement elle est applicable à toute molécule possédant un noyau observable (en particulier le proton) non échangeable, ou de vitesse d'échange plus long que la seconde. Ce qui est le cas de la très grande majorité des métabolites cellulaires. Deuxièmement, les éléments à analyser ne doivent pas nécessairement être ionisables (contrairement à une analyse par spectrométrie de masse).

Les premières analyses métabonomiques par RMN ont été réalisées sur de l'urine de rats contaminés par différents toxiques (Gartland *et al.*, 1991). Par la suite, elles se sont portées sur l'analyse d'extraits cellulaires (levure, bactéries, cellules de mammifères), puis généralisées à l'étude d'êtres vivants entiers tels que des vers ou des bactéries (thèse Delphine Bon, 2007). Dans le cas d'analyses alimentaires la métabonomique permet, par exemple, de différencier l'origine des raisins utilisés pour la fabrication d'un vin (Pereira *et al.*, 2005). Les analyses métabonomiques sont également utilisées pour étudier les phénomènes de toxicité. C'est, par exemple, la méthode utilisée par Bailey *et al.*, 2003 et Ducruix *et al.*, 2008, pour analyser les voies métaboliques affectées par une incubation en présence de cadmium chez

des cellules végétales. La principale difficulté de ce type d'analyse réside d'une part dans la faible sensibilité de la RMN, quelques dizaines de nanomoles de matière étant en général nécessaires pour une détection correcte dans un temps raisonnable, et d'autre part dans la qualité et la reproductibilité de l'extraction des métabolites cellulaires (un faible rendement en métabolites ou parcellaire peut être limitant pour l'analyse RMN). Lorsque ces difficultés sont dépassées, cette technique fournit de nombreuses données interprétables grâce à des outils statistiques tels que l'analyse en composante principale (ACP).

- **Analyse en composantes principales (ACP)**

L'ACP est une méthode d'analyse descriptive des données qui consiste à rechercher les corrélations existantes entre N variables aléatoires parmi une population de K individus. De plus, c'est une méthode d'analyse non supervisée, c'est-à-dire qu'elle décrit les échantillons de manière objective sans connaissance a priori de leur classe et caractéristiques. Elle permet de distinguer les directions (ou composantes) de l'espace qui contiennent la plus grande quantité d'information, c'est-à-dire qui expliquent la plus grande variance. Les individus (c'est-à-dire dans cette étude les échantillons, ex : « 100 ppm de CeO₂, Essai 1 ») et les variables (dans cette étude : l'amplitude du signal RMN en fonction des déplacements chimiques, ex : entre 2,30 et 2,35 ppm) sont représentés selon les composantes principales et sont ainsi regroupés ou différenciés suivant leurs variances les uns par rapport aux autres (Bon, 2007).

Pour réaliser une ACP, il faut établir la matrice constituée des K individus (lignes) et des N variables (colonnes).

$$M = \begin{bmatrix} X_{1,1} & \dots & \dots & X_{1,N} \\ X_{2,1} & \dots & \dots & X_{2,N} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ X_{K,1} & \dots & \dots & X_{K,N} \end{bmatrix}$$

Cette matrice est éventuellement normalisée, puis diagonalisée. La diagonalisation donne accès aux valeurs propres de la matrice (déterminant le nombre d'axes à conserver pour expliquer par exemple 90 % de la variance) puis aux vecteurs propres (composantes principales). Il s'agit ensuite de choisir les deux (mais il peut y en avoir plus) composantes principales expliquant le maximum d'informations lors de la projection des individus ou des

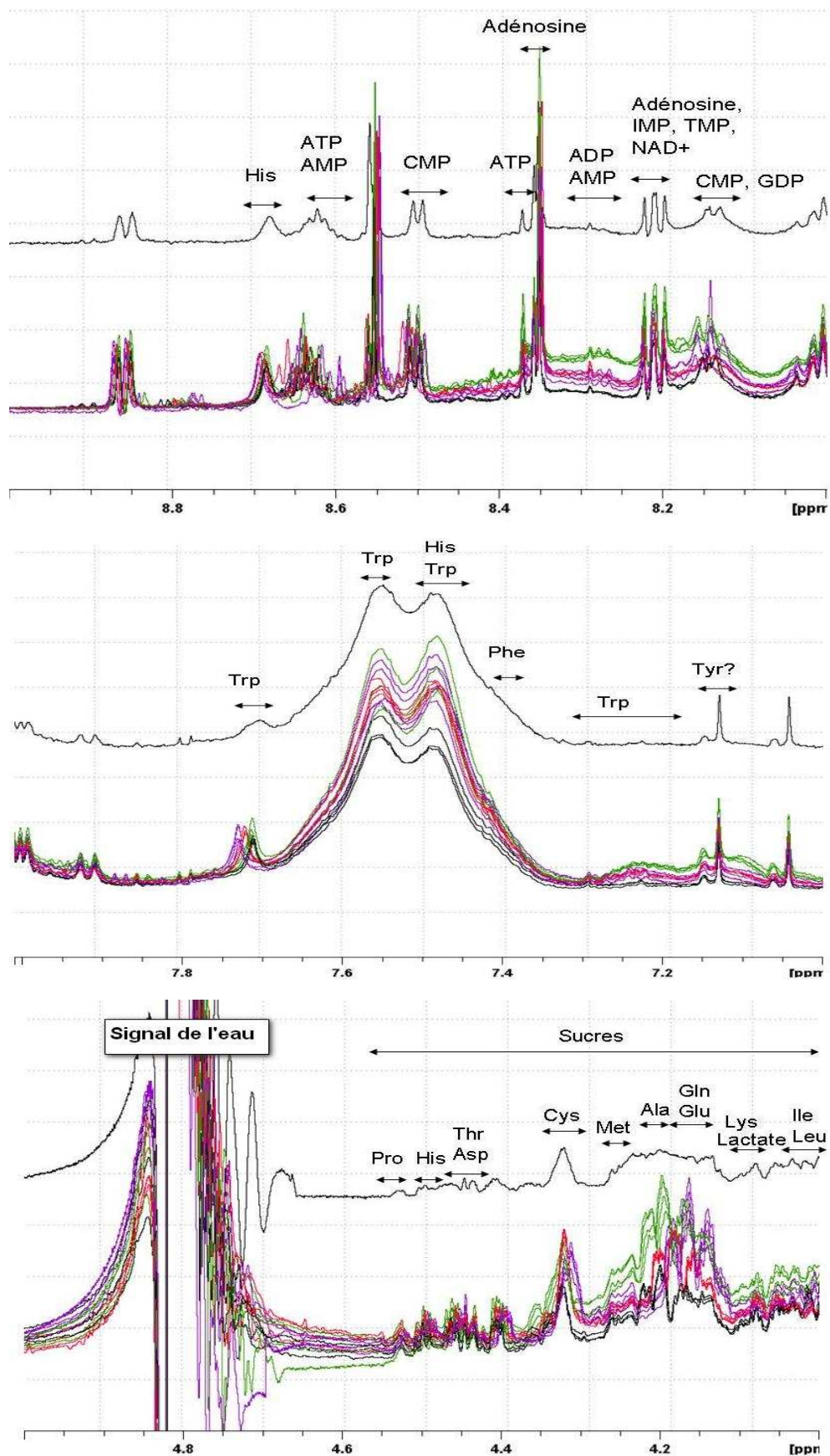


Figure 43 Exemples d'attribution de signaux RMN de 4 échantillons (noir : NPs 100 ppm, rouge : NPs 10 ppm, vert : filtrat 100 ppm, violet : filtrat 10 ppm) répétés 4 fois. Déplacements chimiques 4 à 9 ppm.

variables. L'ACP est une méthode descriptive ayant uniquement pour but de classer et simplifier l'information obtenue. Elle est néanmoins à utiliser avec prudence car les liens observés en ACP n'ont parfois pas de liens réels avec les effets observés sur le spectre et sur les métabolites (Bon, 2007).

V.3.2 Analyse des résultats

Dans cette étude, nous avons comparé les métabolites d'une culture d'*E. coli* soumise à un contact avec des nanoparticules à ceux d'une culture soumise uniquement au filtrat de ces nanoparticules et ceci pour deux concentrations différentes de nanoparticules. Chacune des quatre conditions (nanoparticules 10 ppm, nanoparticules 100 ppm, filtrat 10 ppm et filtrat 100 ppm) a été reproduite 4 fois.

- **Analyse en résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Après 3h de contact avec les nanoparticules ou leurs filtrats dans l'eau, les métabolites d'*E. coli* ont été extraits par ajout d'acide perchlorique (voir matériels et méthode V.5.4). Cette étape évite la dégradation enzymatique pendant l'extraction ainsi que la présence de protéines et de macromolécules acides (Fan, 1996). Les cultures ont été centrifugées afin de séparer les métabolites hydrosolubles des autres composés tels que des morceaux de membrane ou des protéines. L'analyse des métabolites a ensuite été effectuée sur un spectromètre RMN à 600 MHz. Chaque spectre a été redressé par correction de la ligne de base et normé de manière identique.

Par simple observation et comparaison des spectres, il est possible de distinguer des différences importantes de variation d'intensité de signal selon les conditions environnementales. Il est cependant rare de pouvoir attribuer chaque signal à un métabolite. Tout d'abord ce travail serait très long car il nécessiterait d'analyser tous les métabolites séparément en RMN afin de pouvoir attribuer tous les déplacements et couplages chimiques. Or les déplacements sont aussi très sensibles à l'environnement chimique et sont susceptibles de dépendre de la présence d'autres métabolites. De plus, la grande quantité de signaux obtenus et la limite de résolution ne permet pas toujours de distinguer nettement les signaux de façon individualisée (il y a recouvrement de certains signaux). Enfin, les signaux (et donc métabolites) visibles sur les spectres ne sont pas tous équivalents en matière de quantité d'informations qu'ils fournissent. En effet, si l'intensité d'un signal change peu, ou

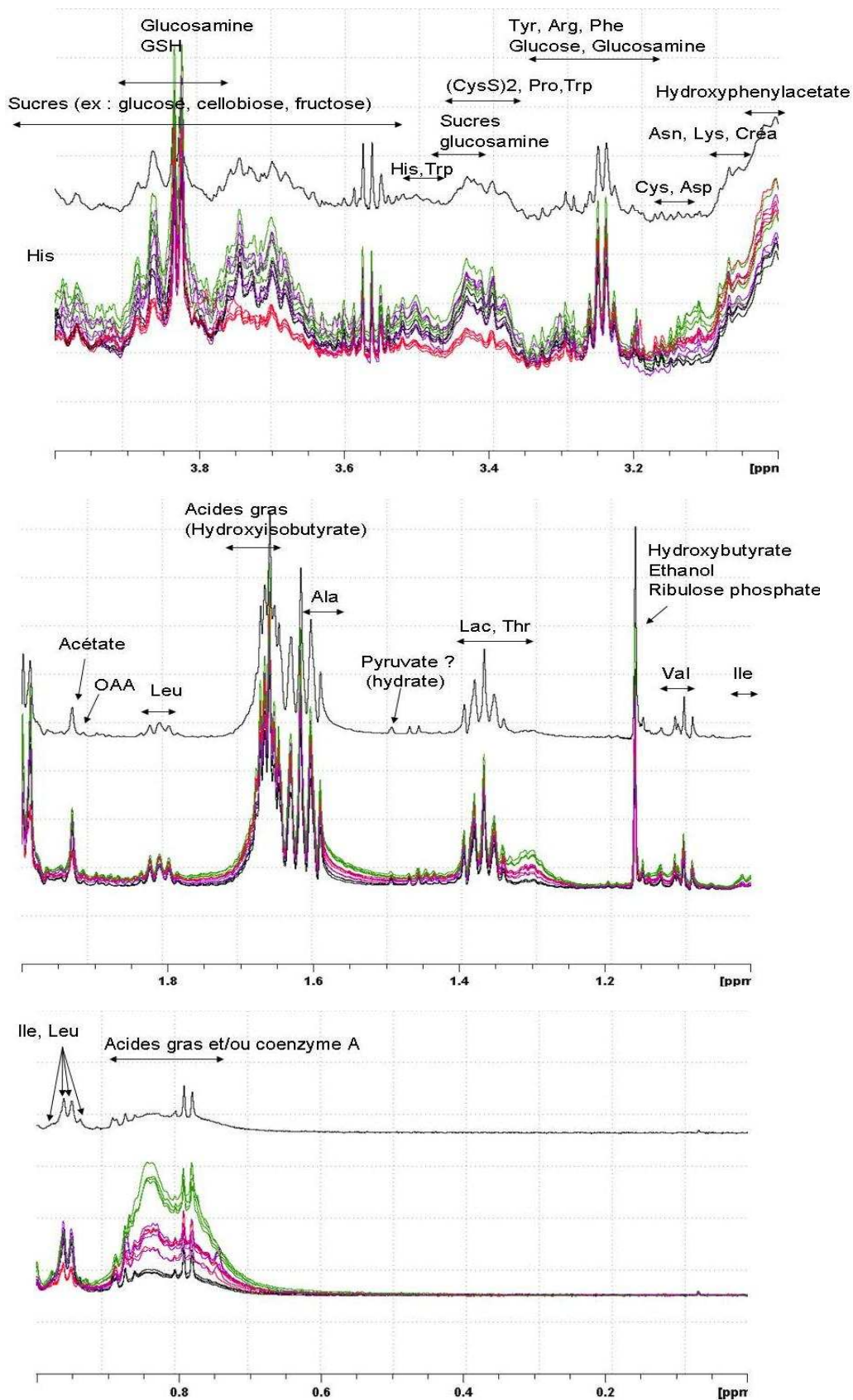


Figure 44 Exemples d'attribution de signaux RMN de 4 échantillons (noir : NPs 100 ppm, rouge : NPs 10 ppm, vert : filtrat 100 ppm, violet : filtrat 10 ppm) répétés 4 fois. Déplacements chimiques de 0 à 4 ppm.

de façon négligeable, suivant les différentes conditions de l'expérience, il est peu probable que le métabolite à qui il est attribué soit impliqué dans une voie métabolite touchée de façon importante par le toxique. Nous attribuerons donc uniquement les signaux qui, d'après l'analyse ACP, sont les plus influencés par les changements de conditions expérimentales.

- **Attribution des signaux de résonance**

L'attribution des signaux nécessite des données de référence des métabolites standards à un pH identique à celui des échantillons analysés. La plupart des données sont fournies à un pH neutre et non acide comme c'est le cas dans notre étude. Les spectres (Figure 43 et Figure 44) ont été interprétés à partir des données de déplacements chimiques des métabolites standards en milieu acide (pH=3) (Fan, 1996). Ces attributions (notées sur le spectre noir qui a été arbitrairement décalé afin de mieux distinguer les signaux) ne sont que des propositions et sont à considérer avec prudence car elles sont uniquement basées sur les déplacements chimiques trouvés dans les tables et non sur les couplages et intensités relatives des signaux. L'analyse des spectres RMN obtenus après l'ajout de standards en relativement faible concentration dans les échantillons devrait permettre une attribution précise des signaux, et est une perspective à ce travail.

Il est cependant possible d'attribuer certaines régions du spectre à des grandes familles de fonctions chimiques. Les aldéhydes se trouvent dans la région du spectre comprise entre 9 et 10 ppm. Cependant aucun signal n'a été attribué dans cette région. Les protons de cycles aromatiques (présents notamment dans les acides nucléiques et aminés) résonnent généralement entre 6 et 9 ppm. On y retrouve par exemple le tryptophane, l'histidine, la phénylalanine ou encore la tyrosine.

Les régions entre 8 et 8,7 ppm (domaine des protons amidiques et aromatiques) ainsi qu'autour de 6 ppm correspondent aux domaines des métabolites impliqués dans les cycles énergétiques de type ADP, ATP, AMP, CMP... Entre 3,5 et 4,5 ppm on retrouve la région de la plupart des signaux des sucres (type cellulose, glucose...). Leur attribution est difficile car les spectres de résonance des sucres comportent de nombreux massifs complexes dans des zones de recouvrement identiques (zone des esters et alcools). Cette zone comporte également des signaux de résonances de nombreux acides aminés (alanine, histidine, lysine) ainsi que des molécules impliquées dans les phénomènes d'oxydoréduction cellulaire (glutathion « GSH »). Cette zone très riche en signaux montre des variations importantes d'intensité en

fonction des conditions. La variation d'intensité des signaux n'est cependant pas homogène dans la zone de déplacement chimique comprise entre 3,5 à 4,5 ppm. On ne peut donc pas conclure à une augmentation ou diminution générale en présence de nanoparticules ou de filtrats, il faudrait traiter chaque signal de manière indépendante ou, comme nous le verrons un peu plus tard, par des analyses ACP/ PLS DA. Les N-CH₃ résonnent généralement entre 2,5 et 3,3 ppm. Entre 1,5 et 2,5 on trouve la zone des protons aliphatiques CH₂ et CH₃. Les signaux à champ fort (petits déplacements chimiques) sont attribuables à des acides gras mais leur signature est trop complexe pour permettre une attribution plus précise.

- **Analyse en composantes principales (ACP)**

Le nombre d'individus dans cette étude est de 16 (les 4 conditions différentes répétées 4 fois). Afin d'établir un jeu de variables, les spectres obtenus en RMN ont été découpés en pas de 0,05 ppm. Cet intervalle permet de prendre en compte les éventuelles variations de déplacements chimiques dues au pH tout en conservant un maximum d'informations. Chaque intervalle de déplacement chimique constitue une variable (152 au total lorsque l'on retire la zone contenant le signal de l'eau). Les spectres ont été normalisés, c'est-à-dire que chaque intégrale a été divisée par la somme des intégrales du spectre des zones retenues et multipliée par une constante K choisie. Cette opération permet de limiter les différences de concentration entre échantillons et de les rendre ainsi comparables. Les valeurs obtenues après normalisation constituent une matrice de 16 lignes (individus) et 152 colonnes (variables). Les données subissent ensuite une opération destinée à les rendre centrées réduites en les divisant par leur écart-type. Cette opération permet de mettre tous les signaux, quelque soit leur intensité, à un poids identique. En effet, les signaux les plus intenses sont souvent ceux qui ont la plus grande variance mais ne sont pas forcément ceux qui expliquent la plus grande partie de l'information. A contrario, cette méthode favorise le poids du bruit de fond. Pour limiter ce problème, nous avons établi un seuil de coupure pour ne prendre en compte que les signaux supérieurs à une certaine valeur (un millième de K) et utilisé une méthode centrée-réduite plus « douce », appelée Pareto. Cette méthode consiste à diviser les données par la racine carrée de l'écart-type au lieu de l'écart-type.

La Figure 45 représente la projection des individus, c'est-à-dire les échantillons (seul l'échantillon 1 n'a pas pu être analysé à cause d'un problème technique lors de l'extraction) selon les deux premières composantes principales de l'ACP qui expliquent 90 % de la

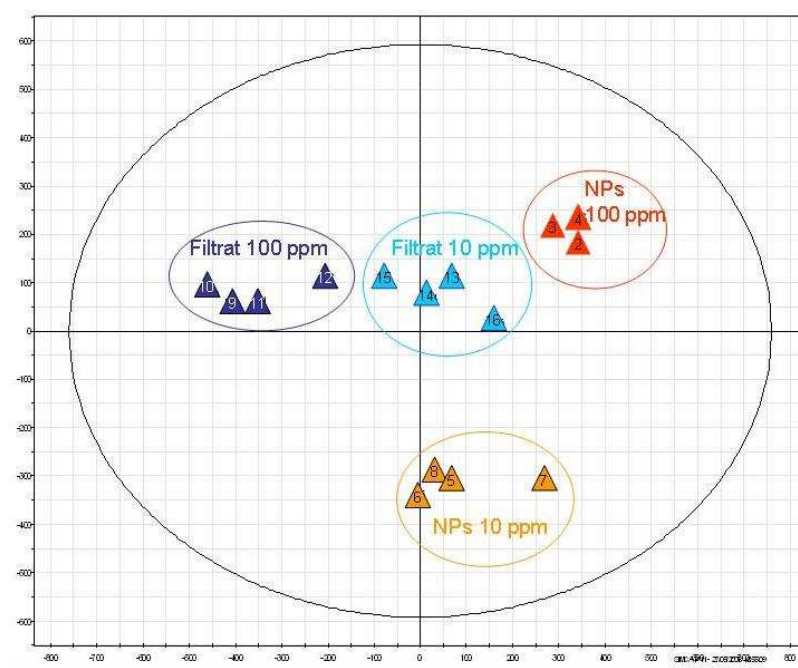


Figure 45 Représentation en ACP (normalisation Pareto) des analyses RMN des métabolites d'*E. coli* en contact 3h dans l'eau avec des nanoparticules (NPs) de CeO₂ ou avec leur filtrat.

dispersion des données. Les premières observations montrent une bonne répétabilité des expériences puisque les échantillons réalisés dans des conditions identiques sont rassemblés dans une même région de projection. De plus, la distribution des individus suivant les deux premières composantes permet une bonne discrimination des conditions testées. Cette observation confirme les résultats obtenus lors des tests de survie : les nanoparticules provoquent une toxicité différente de celle du filtrat seul. La composante 2 (axe vertical) et la composante 1 (axe horizontal) discriminent les expériences en fonction de leur différence de concentrations respectivement en nanoparticules et en filtrats. La première composante varie en fonction du filtrat et est donc influencée par la concentration en acide nitrique.

A contrario, les groupes ayant subi un contact avec les nanoparticules ne sont visiblement pas ou peu sensibles à la composante 1, l'influence de l'acide nitrique est donc moins importante lorsqu'il y a également présence de nanoparticules.

- **Analyses discriminantes des moindres carrés et attribution de domaines**

Les analyses réalisées en ACP confirment la reproductibilité des expériences et leur bonne discrimination suivant les deux premières composantes principales. Suite à cette constatation, nous avons pu utiliser l'analyse « Partial Least Squares Discriminant Analysis » (PLS-DA). En effet, cette analyse est réalisée en définissant au préalable toutes les répétitions d'une même expérience comme faisant partie du même groupe d'individus : c'est une méthode supervisée. Elle accentue ainsi les variables discriminant chaque groupe de conditions identiques et permet d'identifier les régions du spectre qui contribuent le plus aux deux composantes principales. On considère les écart-types supérieurs à 1 comme significatifs, ce qui représente une quarantaine de variables. La Figure 46 établit la correspondance entre les variables les plus importantes et les métabolites auxquels elles sont potentiellement associées. Leurs projections suivant les deux premières composantes principales sont présentées Figure 47.

- **Interprétation des données métabonomiques**

La représentation PLS-DA (Figure 47) permet de visualiser l'orientation des variables suivant les deux composantes principales. D'après les attributions effectuées Figure 46, il est possible d'établir cinq domaines principaux :

- les sucres,
- les acides gras,

Région intégrée (ppm)	Nom de la variable	Poids			
4,25	4,2	84	2,356	Sucres	Met
1,7	1,65	135	2,218	acides gras	hydroxyisobutarate
8,55	8,5	26	2,179	CMP	
4,15	4,1	86	2,022	Sucres	Lactate
2,95	2,9	110	1,887	GSH	Glucosamine
2	1,95	129	1,868		
3	2,95	109	1,848	GSH	Glucosamine
0,85	0,8	152	1,790	acides gras	coenzyme A
3,75	3,7	94	1,763	Sucres	
1,65	1,6	136	1,721	acides gras	alanine
8,6	8,55	25	1,705	AMP	ATP
3,45	3,4	100	1,618	Sucres	Glucosamine
3,7	3,65	95	1,595	Sucres	
0,8	0,75	153	1,557	acides gras	coenzyme A
7,5	7,45	47	1,477	Histidine	Tryptophane
1,2	1,15	145	1,413	Hydroxybutyrate	Ribulose Phosphate
3,9	3,85	91	1,399	Glucosamine	GSH
2,15	2,1	126	1,393	GSH	Met
7,55	7,5	46	1,373	acides nucléiques aromatiques	
3,05	3	108	1,365	Hydroxyphénylacétate	Asn
4,2	4,15	85	1,346	Ala	Glu
3,4	3,35	101	1,308	CysS	Pro
1,75	1,7	134	1,249	acides gras	hydroxyisobutarate
7,6	7,55	45	1,247	Trp	acides nucléiques aromatiques
0,9	0,85	151	1,240	acides gras	coenzyme A
1	0,95	149	1,236	Ile	Leu
9,25	9,2	12	1,217		
1,95	1,9	130	1,206	Acétate	OAA
3,5	3,45	99	1,204	Glu	Gln
3,55	3,5	98	1,197	Glu	Gln
1,4	1,35	141	1,187	CysS	Pro
7,45	7,4	48	1,164	Phe	
1,35	1,3	142	1,161	Lac	Thr
2,9	2,85	111	1,154	GSH	Glucosamine
2,05	2	128	1,114	Arg	
0,75	0,7	154	1,112	acides gras	coenzyme A
8,35	8,3	30	1,096	Adénosine	
3,1	3,05	107	1,042	Asn	Lys
3,85	3,8	92	1,027	GSH	Glucosamine
4	3,95	89	1,018	GSH	Glucosamine
3,8	3,75	93	1,003	sucres	

Figure 46 Liste des régions intégrées avec le nom de la variable correspondante. Traitement par PLS-DA et classification des variables par poids décroissant de leur variance calculée sur les 16 échantillons. Exemples d'attribution des quarante signaux les plus représentatifs à différents métabolites.

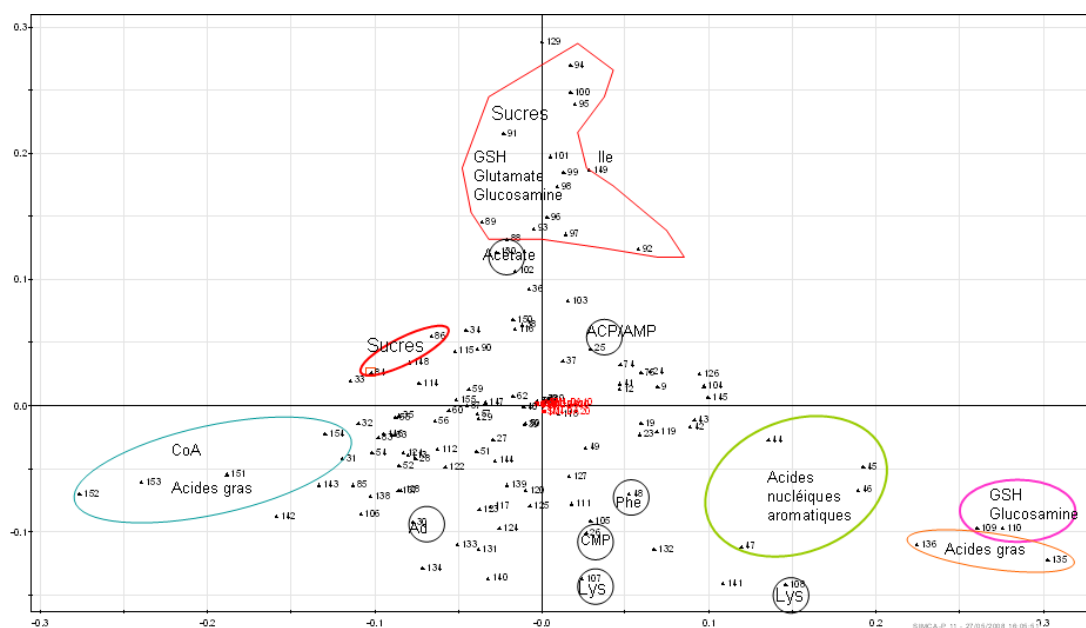


Figure 47 Projection en PLS-DA (normalisation Pareto) des variables et attribution de certaines d'entre elles.

- le glutathion, glutamate, glutamine et la glucosamine,
- la coenzyme A (CoA) et
- les acides aminés aromatiques (tryptophane, histidine, tyrosine et phénylalanine).

La projection des variables selon les deux premières composantes principales est reliée à la projection des individus. Par exemple, les signaux de la zone correspondant aux sucres varient suivant la première composante (verticale), ils sont donc plus faibles dans les échantillons contenant 10 ppm de nanoparticules (car projetés sur la partie opposée de l'axe) que dans les autres échantillons. Les autres grandes classes de molécules varient suivant la deuxième composante principale (horizontale), donc dépendent de la concentration du filtrat. La catégorie « glutathion (GSH, glutamate et glutamine » varie selon les deux composantes car on trouve également des signaux qui leur sont attribués dans la zone associée aux sucres. Les acides gras varient en quantité et en type, en fonction de la concentration des filtrats. De plus, de façon a priori contradictoire, les extraits provenant des cultures mises en contact avec de fortes concentrations de nanoparticules (100 ppm) ne semblent pas suivre la même tendance. Si on considère, cependant, que les acides gras analysés proviennent de la membrane cellulaire, la présence d'une grande concentration d'acide nitrique favorise probablement leur détachement par une lyse membranaire partielle. En revanche, nous avons vu (chapitre IV) que les nanoparticules, à partir d'une certaine concentration seuil, se retrouvent en une monocouche compacte sur la paroi cellulaire d'*E. coli*. Pour une concentration en nanoparticules de 100 ppm, ce seuil est largement atteint et dépassé. Il est donc possible que les nanoparticules forment une couche rigide et limitent la libération d'acides gras dans le milieu extracellulaire.

Les groupes « filtrat 10 ppm » et « NPs 10 ppm » se distinguent uniquement suivant la deuxième composante principale. À cette concentration les nanoparticules ont donc un impact direct sur les voies métaboliques impliquant des sucres mais également le glutathion, le glutamate, la glutamine et de la glucosamine. A contrario, les métabolites du groupe « NPs 100 ppm » sont peu sensibles aux deux premières composantes principales. Ce groupe est finalement proche du groupe « filtrat 10 ppm ». Ceci semble relativement contradictoire, excepté si la cinétique de mortalité des bactéries est très rapide. En effet, la synthèse de métabolites en réponse à un toxique donné nécessite un certain temps de latence. Si la mortalité est plus rapide que ce temps de latence, les métabolites analysés ne sont alors pas

représentatifs du toxique mais de l'état de la culture avant l'ajout du toxique. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait analyser les métabolites d'une culture cellulaire n'ayant subi aucun contact avec un toxique ni incubation prolongée dans l'eau. De manière générale, le glutathion est mobilisé dans les réactions d'oxydoréduction (Luikenhuis *et al.*, 1998), et les sucres dans le transport de cations et protons à travers les membranes. Le glutamate (Foster, 2004) et la lysine (Moreau *et al.*, 2007) sont quant à eux impliqués dans la résistance aux conditions acides et la glucosamine dans la synthèse de peptidoglycanes et de lipides (voir « biosynthèse de l'UDP-N-acetyl-D-glucosamine » en annexe p.319). Mais ces composés interviennent également conjointement au cours de diverses transformations métaboliques (pour plus de détails voir <http://biocyc.org>). Par exemple, la glutamine se transforme en glutamate pyruvate au cours de la biosynthèse de la sérine et du tryptophane (Crawford, 1989). La biosynthèse des peptidoglycanes et de certains lipides met en jeu un sucre (fructose-6- phosphate), la glutamine (transformée au cours de la biosynthèse en glutamate), la glucosamine phosphate, ainsi que la coenzyme A (Kotnik *et al.*, 2007). La glucosamine et le ribulose-5-phosphate sont pour leur part impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides (voir « Biosynthèse des lipopolysaccharides » en annexe p.320).

V.3.3 Conclusion sur l'analyse métabonomique

Cette étude confirme que la toxicité due aux nanoparticules est significativement différente de la toxicité uniquement induite par le filtrat de ces nanoparticules.

L'analyse ACP montre que les nanoparticules, à faibles doses, jouent un rôle dans les voies métaboliques incluant des sucres, le glutathion et glucosamine. De plus, l'augmentation de la concentration des filtrats a une influence sur la présence des acides gras et de la coenzyme A (notamment reliés par la réaction de biosynthèse des lipides).

Cette étude nous a également permis d'émettre l'hypothèse d'une mortalité extrêmement rapide pour les concentrations importantes en nanoparticules (100 ppm). Cette mortalité serait plus rapide que le temps de latence nécessaire à la modification du métabolisme d'*E. coli*. Nous ne pouvons cependant pas, à ce stade des expériences, conclure précisément quant aux voies métabonomiques touchées lors d'un contact avec des nanoparticules mais ces expériences préliminaires permettent d'orienter les soupçons sur certaines d'entre elles, à savoir : les mécanismes de résistance à l'acidité, le transport de cations et protons transmembranaires par l'intermédiaire des sucres, la biosynthèse de peptidoglycanes, lipides et lipopolysaccharides.

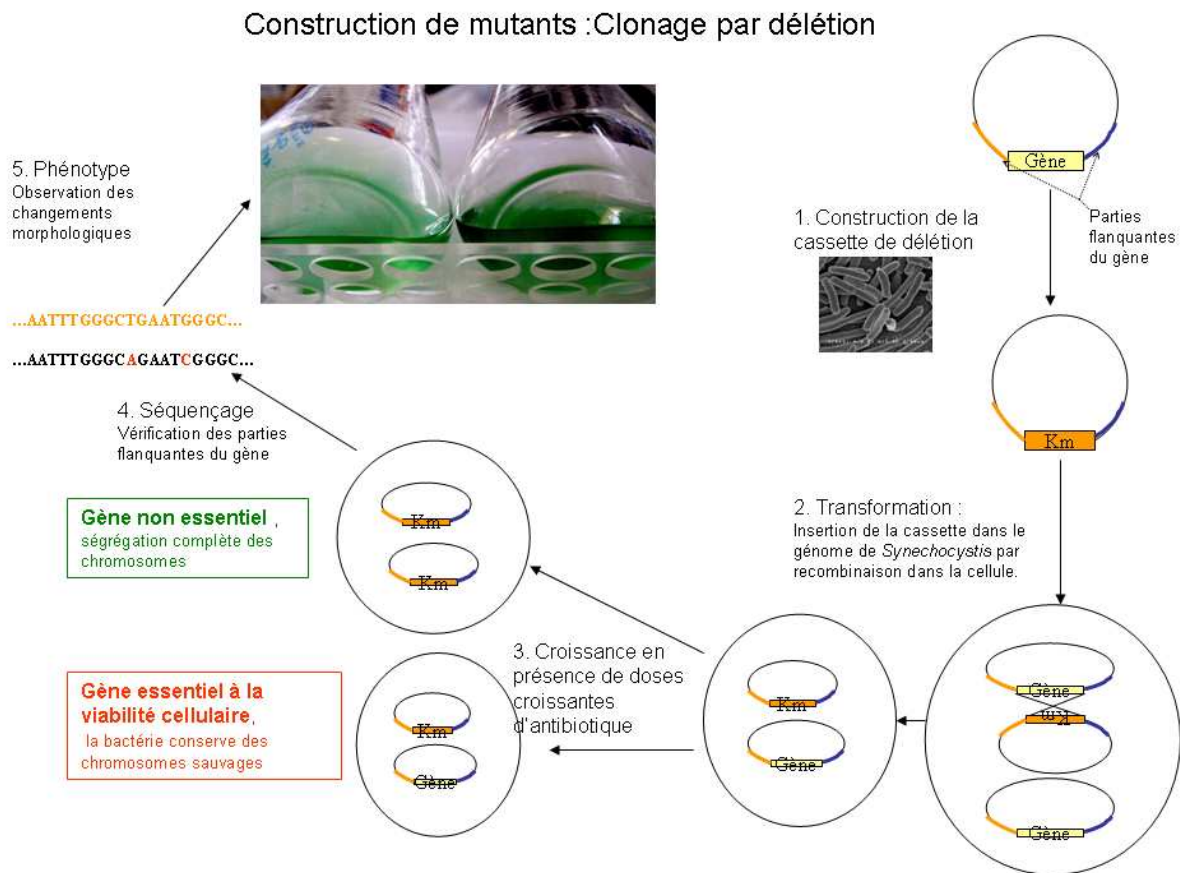


Figure 48 Schéma générale de la technique de construction des mutants : le clonage par délétion.

Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ces hypothèses. Une autre perspective intéressante à ce travail serait d'analyser les spectres en fonction du temps de contact avec les nanoparticules.

V.4 Etude de l'influence des exopolysaccharides : construction de mutants.

D'après les résultats obtenus en microscopie électronique et lors des tests de survie, les exopolysaccharides (EPS) semblent tenir une place primordiale lors d'une mise en contact entre les nanoparticules de CeO₂ et *Synechocystis*. En effet, l'absence d'EPS chez *E. coli* rend les cellules sensibles aux NPs en permettant un contact direct entre ces dernières et la paroi cellulaire, et induit ainsi une toxicité spécifique aux nanoparticules (voir parties V-2). D'où la question suivante : quels auraient été les effets des nanoparticules sur *Synechocystis* si celles-ci avaient pu entrer directement en contact avec la paroi cellulaire sans être arrêtées par la barrière naturelle que constituent les EPS ? Pour répondre à cette question nous avons tenté de construire des mutants de *Synechocystis* dépourvus d'EPS.

V.4.1 Construction des mutants d'EPS de *Synechocystis*

Les détails méthodologiques précis de la construction des mutants sont décrits dans la partie « Matériels et méthodes, V.5.5 ».

- **Principe de l'inactivation de gène chez *Synechocystis***

La stratégie classique chez *Synechocystis* pour éliminer un gène d'intérêt consiste à le remplacer par un autre gène, un marqueur génétique, qui code pour une fonction avantageuse permettant la sélection du clone mutant résultant (voir Figure 48).

La cassette de délétion résultante est introduite chez *Synechocystis* par transformation, où les recombinaisons génétiques permettent son intégration dans le chromosome, en remplacement du gène à éliminer. A l'issue de cette étape, seule une des dix copies du chromosome cyanobactérien a reçu la cassette de délétion. Par recombinaison avec l'ADN de l'hôte (ici *Synechocystis*), puis par réplifications successives du génome, une partie de l'ADN de la cellule est remplacée par de l'ADN dépourvu du gène « EPS » mais comportant une résistance à un antibiotique. Les cellules ainsi transformées sont cultivées sur des milieux de culture contenant des concentrations croissantes en antibiotique (dans notre étude : la

kanamycine). L'augmentation de la pression de sélection (i.e. la concentration en antibiotique) sélectionne les clones comportant un maximum de copies de l'ADN porteur de la résistance à l'antibiotique. Lorsque la pression est suffisamment forte, l'intégralité de l'ADN est de l'ADN muté, il y a ségrégation complète des chromosomes. Si malgré la pression de sélection, les cellules conservent des copies de l'ADN sauvage, le gène est considéré comme essentiel à la viabilité cellulaire. La construction génétique est ensuite analysée par séquençage afin de vérifier si le gène a bien été entièrement retiré et si la cassette de résistance a été intégrée à la bonne place dans le génome.

- **Choix des gènes à supprimer**

Nous avons choisi de déléter les gènes de *Synechocystis* codant pour des protéines homologues à ExoD et ExoR impliquées dans le transport des exopolysaccharides. Le gène *alr2882* code chez *Anabaena* (une autre cyanobactérie) pour la synthèse d'ExoD. Les informations disponibles dans « Cyanobase » (<http://bacteria.kazusa.org.jp/cyanobase/>), prédisent que ces protéines sont codées par les gènes suivants de *Synechocystis* : *slr1875* (gène porté par le chromosome) et *sll5052* (gène porté par un plasmide).

- **Construction des cassettes de délétion**

Par PCR reconstitution, les régions génomiques appropriées ont été amplifiées et, simultanément, la phase codante pour les protéines *slr1875* et *sll5052* ont été remplacées par un marqueur génétique codant pour la résistance à un antibiotique.

- **Introduction des cassettes de délétion par transformation dans *Synechocystis***

Les cassettes de résistance ont été indépendamment introduites dans *Synechocystis* par transformation génétique. Les recombinaisons homologues spontanées ont permis l'introduction du gène marqueur en lieu et place des gènes à supprimer. Les clones transformants sélectionnés sur la base de leur résistance à l'antibiotique sélectif ont été cultivés pendant plusieurs générations en présence de doses croissantes d'antibiotiques afin d'avantager la propagation des copies mutantes du chromosome cyanobactérien polyploïde (ou plasmide) au détriment de la propagation des copies sauvages. À une pression de sélection de 300 µg/ml de kanamycine, nous avons vérifié (PCR et séquençage) avec plusieurs clones de chacun des deux mutants, l'absence de copies de génome de type sauvage, montrant ainsi que la ségrégation des génomes a été totale. Ceci indique que les gènes éliminés ne sont pas



Figure 49 A gauche, erlenmeyer contenant la souche mutée $\Delta slr5052-10$ de *Synechocystis*, à droite erlen contenant la souche sauvage de *Synechocystis*.

Mise en évidence d'un phénotype différent : la souche mutée reste accrochée sur les parois en verre.

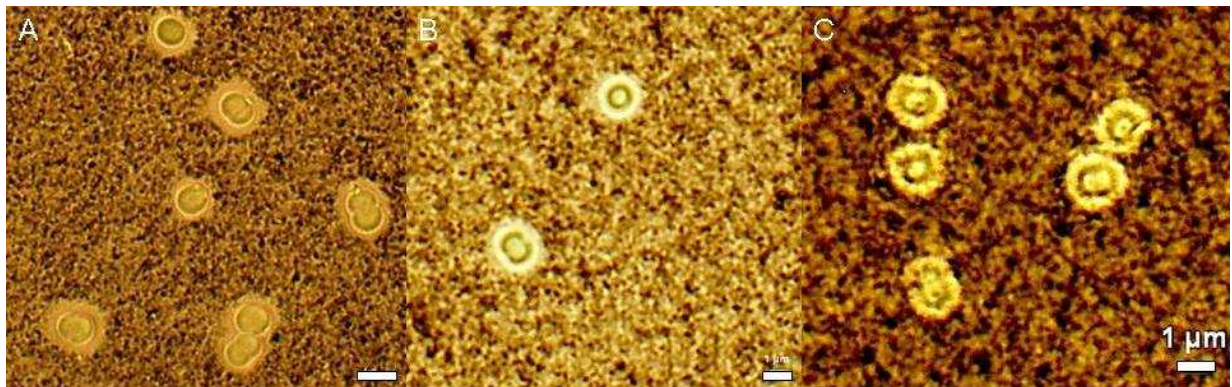


Figure 50 Observations au microscope optique de la souche sauvage de *Synechocystis* (A), et de ses mutants d'EPS : $\Delta slr1875-2$ (B) et $\Delta slr5052-10$ (C).

Observations réalisées dans l'eau ultrapure en présence d'encre de Chine. Barres d'échelle : 1 μm .

essentiels à la croissance de *Synechocystis* cultivée dans les conditions standards. Une fois les mutants obtenus, il s'agit de définir leurs différences par rapport à la souche sauvage.

V.4.2 Résultats

V.4.2.1 Caractérisation des mutants

- **Observation macroscopique**

Une culture des souches mutantes présente des différences par rapport à la souche sauvage, en effet, la souche Δ sl15052-10 a la particularité d'adhérer aux parois en verre des erlenmeyers dans lesquels elle est cultivée (Figure 49). Cette particularité est également observée chez la souche sauvage d'une autre cyanobactérie *Synechococcus* S7942. La souche Δ slr1875-2 présente quant à elle, en début de phase stationnaire, une viscosité plus importante que celle de la souche sauvage. En effet, les mutations ont touché les EPS qui ont un rôle important dans la stabilité et l'aspect plus ou moins visqueux de la culture.

- **Interaction EPS-Encre de Chine**

Les observations en microscopie électronique en présence d'encre de Chine (Figure 50) mettent encore en évidence la présence d'une zone claire autour des cellules pour les deux souches mutantes. Ceci démontre que les cellules synthétisent encore des EPS malgré les mutations. Néanmoins, dans le cas du mutant Δ sl15052-10 (photographie C), on observe la présence de quelques colloïdes de l'encre de Chine dans la zone claire autour des cellules. Ceci suggère une différence dans la composition des EPS. Ces derniers sont sans doute moins chargés que leurs homologues de la souche sauvage, diminuant la répulsion électrostatique avec l'encre de Chine. Le mutant Δ slr1875-2 (photographie B) semble en revanche identique à la souche sauvage.

- **MEB**

Il y a donc bien des EPS autour des souches mutantes, cependant, les différences de phénotypes macroscopiques (Figure 49) et microscopiques (Figure 50) suggèrent une composition ou un agencement différents des EPS autour des mutants. Afin de vérifier cette dernière hypothèse, nous avons effectué des observations des souches mutantes en microscopie électronique à balayage (MEB).

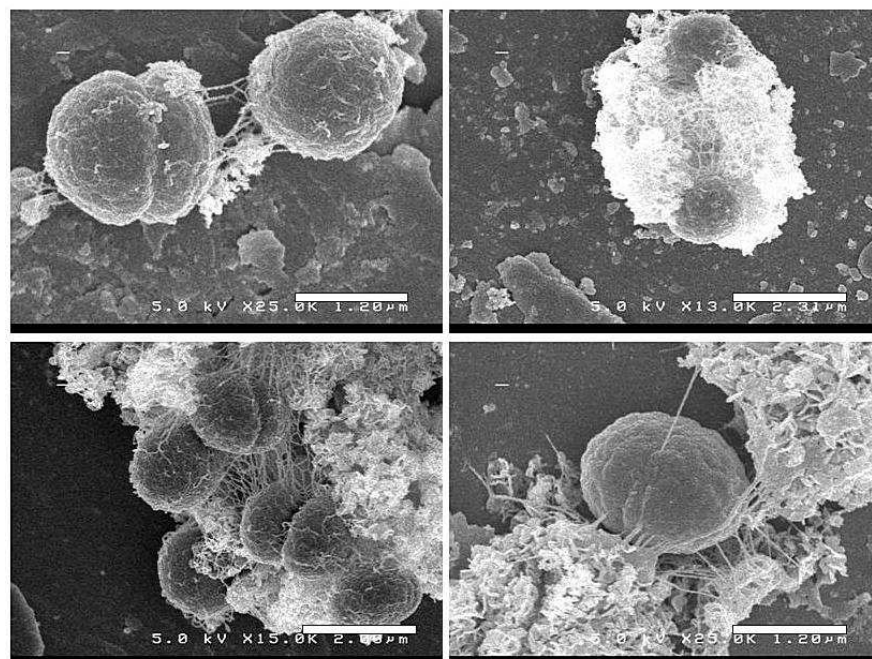


Figure 51 Observations MEB de la souche mutante sll5052-10.

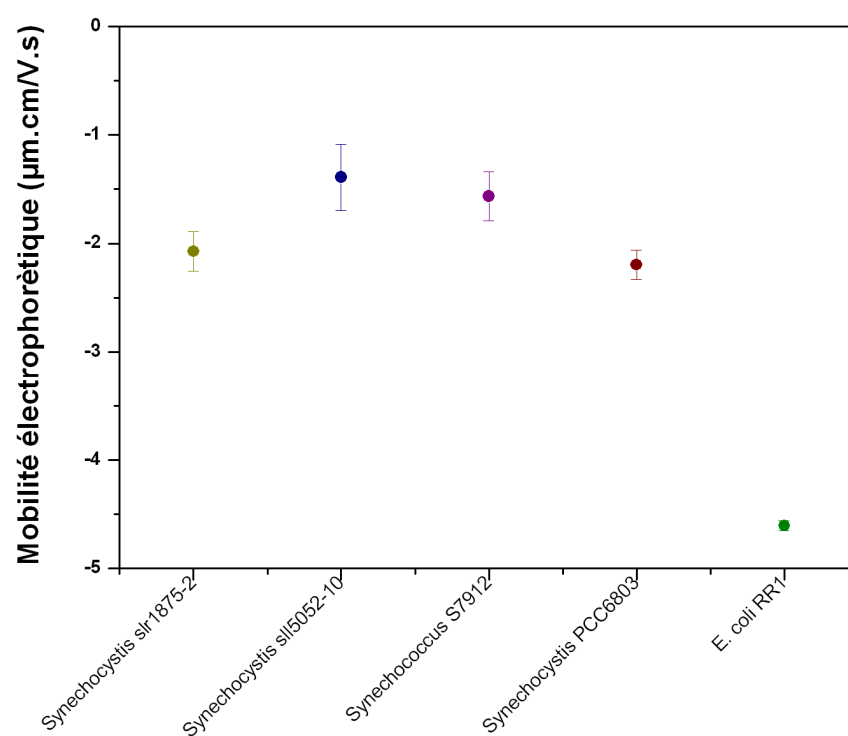


Figure 52 Mesures de mobilités électrophorétiques de différentes cultures de cyanobactéries et bactérie étudiées après trois lavages à l'eau ultrapure.

- **Mobilité électrophorétique**

Les images obtenues ne montrent aucune différence notable dans l'agencement des EPS entre la souche sauvage (voir chapitre III, 2.3.2) et les souches mutantes (Figure 51, exemple pour la souche Δ sll5052-10). De même, l'abondance relative des EPS des différentes souches n'est pas significativement différente. La mobilité électrophorétique des cellules a été mesurée. Le mutant Δ slr1875-2 présente une mobilité électrophorétique légèrement plus élevée (-2,07 $\mu\text{m.cm/V.s}$) que celle de la souche sauvage (-2,20 $\mu\text{m.cm/V.s}$) mais cette différence est peu significative. En revanche, la mobilité électrophorétique du mutant Δ sll5052-10 est particulièrement élevée (-1,4 $\mu\text{m.cm/V.s}$ par rapport à -2,20 $\mu\text{m.cm/V.s}$ pour *Synechocystis* sauvage) et est équivalente à celle de la souche *Synechococcus* S7942. Cette similarité concorde avec une adhérence au verre identique pour ces deux souches. La délétion du gène sll5052 semble donc toucher une des voies de synthèse des EPS anioniques.

V.4.2.2 Analyses des EPS

- **Analyses IR**

Les observations macroscopiques et les analyses des potentiels zêta suggèrent que les EPS des mutants diffèrent de ceux de la souche sauvage. Comme ces différences résident dans des différences de composition chimique (type et abondance de fonctions chimiques constituant les EPS), elles sont visibles par spectroscopie infrarouge. Pour réaliser ces mesures, il a tout d'abord été nécessaire d'isoler et purifier les EPS (Panoff, 1989). Ces étapes sont longues et délicates (voir matériels et méthode V.5.6) car le rendement d'extraction (effectuée après une semaine en phase stationnaire) des EPS est très faible : de l'ordre de 65 $\mu\text{g/mL}$ pour la souche sauvage et de 40 $\mu\text{g/mL}$ pour les mutants. Le résultat des spectres infrarouge en transmission est présenté Figure 53 et Figure 54.

La zone de longueurs d'ondes comprises entre 3300 et 3400 cm^{-1} est la zone de fréquence des amides mais également de l'eau. Cette bande est souvent présente dans les échantillons non complètement secs. Entre 2900 et 3000 cm^{-1} se trouve la bande de fréquence des groupements méthylènes associés aux phospholipides. La bande autour de 1650 cm^{-1} est attribuée aux protéines comportant des amides primaires ($-\text{CO}-\text{NH}_2$). Elle est sensible à la structure secondaire de la protéine (ex : hélice α ou feuillet β), à ses interactions avec des ligands et à son repliement. Les amides secondaires ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$) se trouvent en général autour de 1540 cm^{-1} . La bande vers 1390-1400 cm^{-1} correspond à la vibration (ν C-O) des

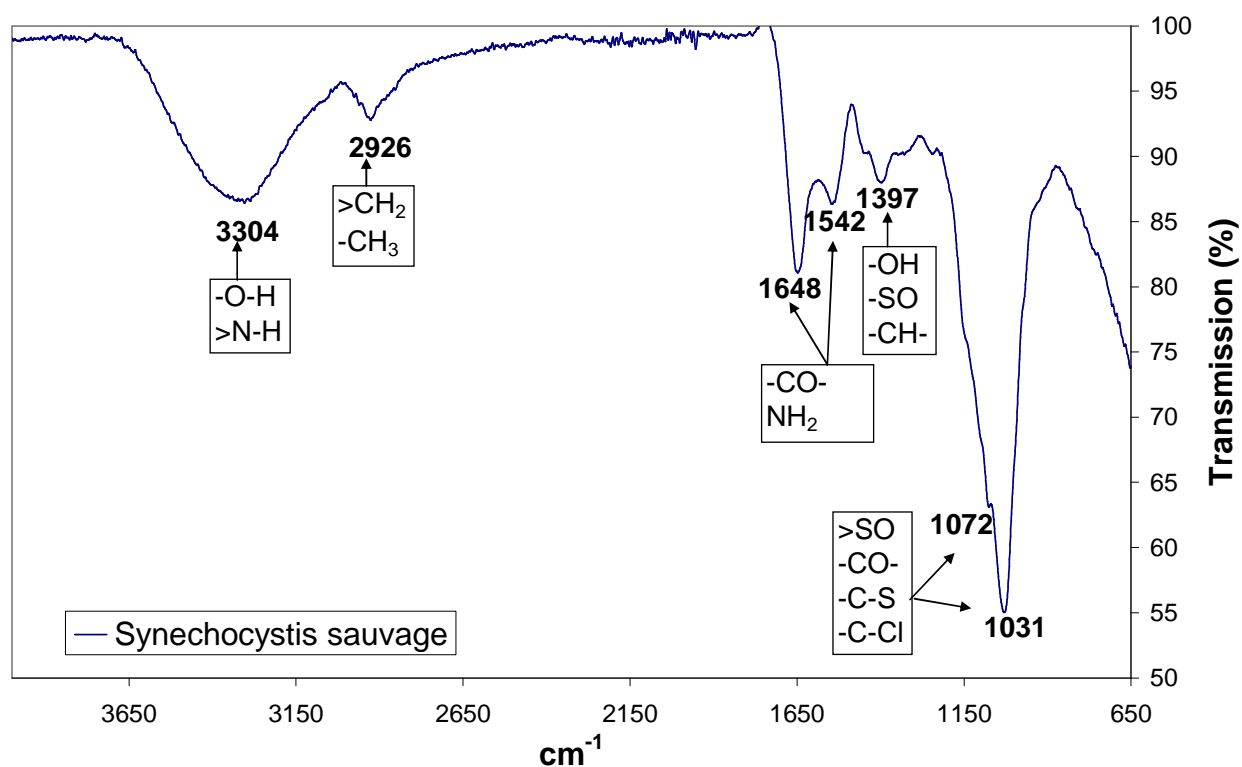


Figure 53 Spectres infrarouges de *Synechocystis sauvage* avec proposition d'attribution de certaines bandes Hesse et al., 1997.

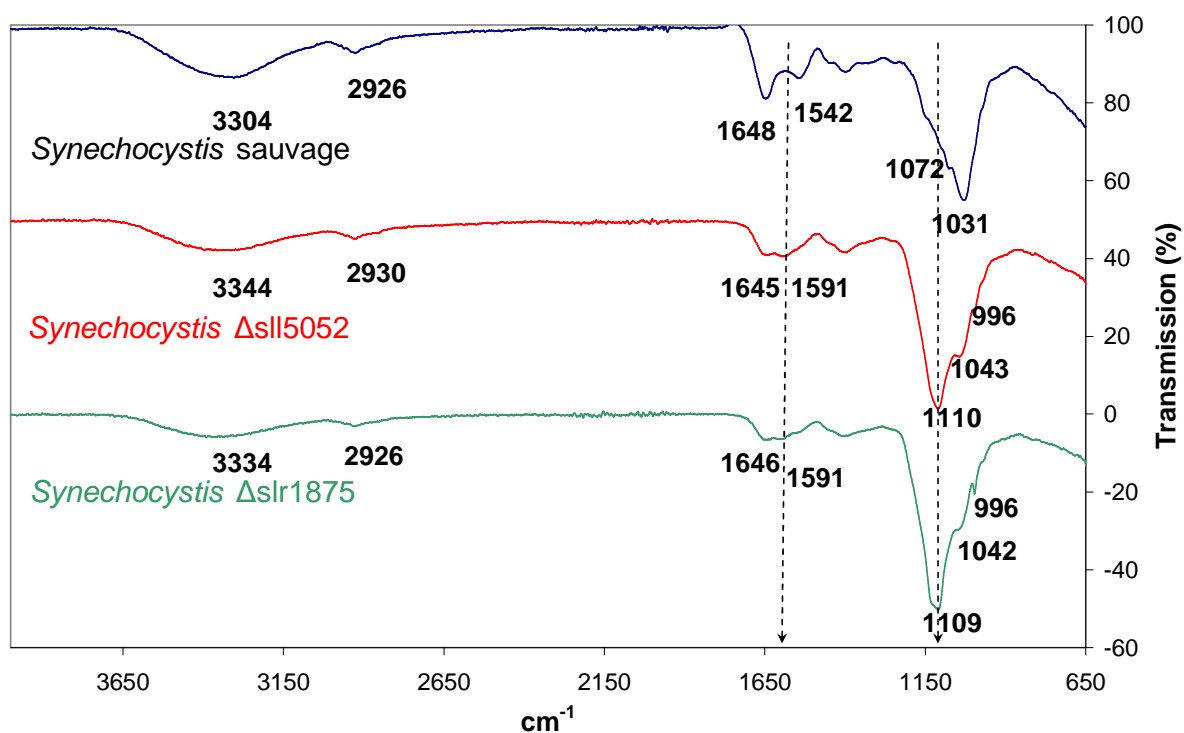


Figure 54 Spectres infrarouges de *Synechocystis sauvage* et de deux mutants d'EPS de *Synechocystis* : $\Delta\text{slI}5052$ -10 et $\Delta\text{slr}1875$ -2.

acides carboxyliques. Entre 900 et 1200 cm^{-1} s'étend une large bande qui est principalement attribuée aux polysaccharides (Benning *et al.*, 2004). Les spectres de la Figure 54 sont comparables pour toutes les régions hormis la zone des alcools (entre 3300 et 3350 cm^{-1}), la zone des protéines (entre 1540 et 1640 cm^{-1}) et la zone des polysaccharides (entre 900 et 1200 cm^{-1}). Les bandes entre 1540 et 1640 cm^{-1} sont moins définies chez les mutants que chez la souche sauvage. Cette constatation est cohérente avec des mutations *sll5052* et *slr1875* sensées toucher la synthèse des protéines de transfert des exopolysaccharides. En effet, les mutations affectent, notamment, la synthèse d'exoD, il semble naturel que celle-ci soit moins présente dans les EPS extraits des cultures mutantes.

La bande entre 900 et 1200 cm^{-1} est en réalité constituée de plusieurs bandes (notamment à 1110, 1070, 1040, 1030 et 1000 cm^{-1}) correspondant aux différents sucres constitutifs des polysaccharides. Les EPS de *Synechocystis* PCC6803 (Panoff *et al.*, 1988) sont constitués majoritairement de : glucose (23,4 % en masse de sucres), fucose (20,9 %), mannose (13,7%), rhamnose (12,5%) et xylose (12,2%) pour les sucres neutres, et de glucosamine (65% en masse d'osamines) et d'acides uroniques (16,4 % en masse de sucres) . Les intensités relatives des bandes correspondant aux polysaccharides varient entre la souche sauvage et les mutants. En effet, les bandes d'adsorption à 1070 et 1030 cm^{-1} disparaissent chez les mutants. Il est donc probable qu'un des constituants majoritaires des EPS de *Synechocystis* sauvage ne soit plus synthétisé chez les mutants $\Delta\text{sll5052}$ et $\Delta\text{slr1875}$. En revanche, les bandes à 1110 et 1040 cm^{-1} , existantes mais minoritaires chez la souche sauvage, sont amplifiées chez les mutants, ce qui suggère que ces derniers synthétisent d'autres constituants polysaccharidiques en plus grande quantité. De plus, les EPS de $\Delta\text{sll5052-10}$ et $\Delta\text{slr1875-2}$ ont des signatures infrarouges quasiment identiques, néanmoins la différence de mobilité électrophorétique entre les deux souches mutantes confirme une différence dans les EPS, probablement au niveau des polysaccharides chargés (ex : acide uronique, glucosamine).

Les mutations réalisées n'ont pas permis de retirer tous les EPS de *Synechocystis*, elles ont néanmoins montré que *sll5052* et *slr1875* sont bien deux gènes impliqués dans la biosynthèse des polysaccharides. Des analyses plus détaillées de ces polysaccharides pourront être réalisées en RMN, spectrométrie de masse, analyse par exclusion stérique ainsi que par des techniques d'analyses classiques des sucres (Dubois *et al.*, 1956).

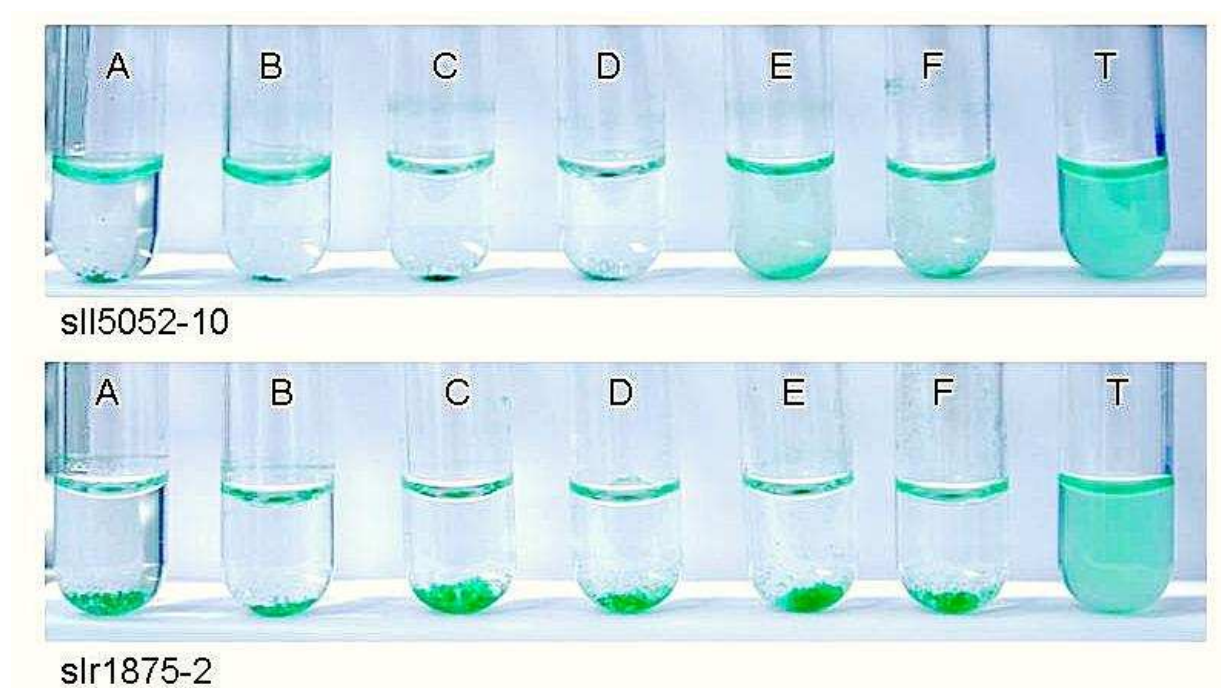


Figure 55 Observations des phénomènes de floculation-décantation de cultures de mutants EPS de *Synechocystis* (en haut Δ sll5052-10, en bas Δ slr1875-2) lavées dans l'eau ultrapure puis mises en contact 3h avec des nanoparticules de CeO_2 .

Concentrations en CeO_2 : A = 476 ppm, B = 238 ppm, C = 120 ppm, D = 60 ppm, E = 30 ppm, F = 15 ppm, G = 7 ppm, T= 0 ppm (témoin).

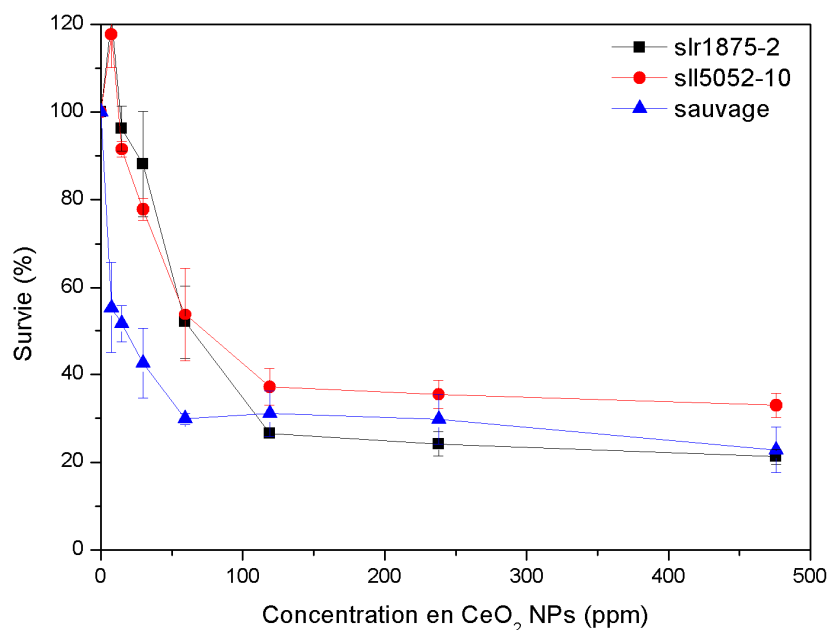


Figure 56 Test Live/Dead réalisé sur les mutants Δ slr1875 et Δ sll5052 ainsi que sur la souche sauvage après une mise en contact de 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 .

V.4.2.3 Floculation des mutants Δ sl15052 et Δ slr1875 en présence de nanoparticules

L'interaction physique entre mutants et nanoparticules de CeO_2 a été étudiée lors de tests de floculation identiques à ceux réalisés pour la souche sauvage (chapitre IV). Les cultures de mutants floculent et décantent après 3h dans l'eau en présence de nanoparticules de CeO_2 . Contrairement aux observations réalisées sur la souche sauvage qui montraient une floculation-décantation limitée à un intervalle de concentration de NPs compris entre 15 et 30 ppm, les cultures de mutants (Figure 55) floculent et décantent pour l'intégralité des concentrations testées (de 7 à 476 ppm de CeO_2). L'interaction des nanoparticules avec les mutants Δ slr1875 et Δ sl15052 de *Synechocystis* est donc plus forte qu'avec la souche sauvage.

V.4.2.4 Tests Live/Dead

Les mutants Δ slr1875 et Δ sl15052 de *Synechocystis* ont également été testés en Live/Dead lors d'une incubation avec des nanoparticules. Dans l'eau ultrapure (Figure 56), les souches mutantes présentent, comme la souche sauvage, une fraction de résistance respectivement à 25 et 40 % de survie. Ce plateau est attribué à une fraction de cellules résistantes à l'acide nitrique. On constate en revanche qu'entre 0 et 100 ppm de CeO_2 , la survie des mutants est nettement améliorée par rapport à celle de la souche sauvage. Cette différence est difficile à interpréter, si ce n'est par la présence éventuelle de polysaccharides différents chez les mutants. Ces polysaccharides seraient enrichis en groupements capables de tamponner une partie de l'acide nitrique lorsque la concentration de celui-ci n'excède pas 100 ppm.

Une interprétation plus fine de ce phénomène nécessiterait de comparer ces tests à d'autres tests de toxicité, par exemple en présence d'acide nitrique ou de particules chargées négativement CeO_2 -PAA. Néanmoins, les mutants d'EPS obtenus étant toujours pourvus d'une couche d'EPS (bien que différente de la souche sauvage), la caractérisation détaillée de leurs interactions avec les nanoparticules a été jugée moins intéressante à poursuivre avant de nouvelles modifications génétiques qui permettront de retirer complètement les EPS.

V.4.2.5 Conclusion sur les mutations réalisées

L'objectif de cette étude était d'obtenir des cyanobactéries dépourvues d'exopolysaccharides, afin de pouvoir étudier l'influence des EPS sur les interactions observées entre les nanoparticules et *Synechocystis* avec et sans EPS et de les comparer à celles observées chez *E. coli*. Cependant, pour envisager la suppression de tout, ou de la majeure partie des EPS, il

faudrait éliminer plusieurs gènes conjointement ; c'est-à-dire construire des mutants doubles ou triples, plus difficiles à obtenir car plus fragiles.

Cependant, ces résultats préliminaires sont encourageants car ils montrent une différence de composition entre les EPS des souches mutantes et ceux de la souche sauvage. De plus, la bonne viabilité des mutants permet de les utiliser lors des tests avec les nanoparticules. Il en résulte des interactions (notamment une floculation plus marquée) avec les nanoparticules différentes de celles observées chez la souche sauvage. Les perspectives de ce travail seraient donc de continuer à supprimer d'autres gènes (notamment ceux qui sont proches les uns des autres) impliqués dans la biosynthèse des EPS par construction de mutants doubles ou triples.

V.5 Matériels et méthodes

V.5.1 Tests de survie en milieu solide (« test en gouttes »)

Les cultures de *Synechocystis* et d'*E. coli* ont été lavées 3 fois dans leur milieu test (voir II.3.3) puis aliquotées en fractions de 2 mL dans des tubes en plastique (Marque Falcon) de 12 mL. Puis 100 μ L du toxique étudié (dilutions de solutions de nanoparticules, ou de filtrat de nanoparticules ou solutions de nitrate de cérium ou acide nitrique préalablement stérilisés par filtration sur filtre 0,22 μ m) ou 100 μ L d'eau ultrapure stérile, pour la fraction témoin, ont été ajoutés sous vortex aux fractions cellulaires. Toutes ces opérations sont effectuées en conditions stériles (hotte à flux laminaire). Les tubes contenant les cultures ont ensuite été placés dans leurs incubateurs agités respectifs pendant un temps donné (en général 3 h).

A l'issue de ce temps d'incubation, 100 μ L de chaque fraction ont été placés dans une plaque 96 puits puis dilués de 10 en 10 (10 μ L dans 90 μ L), dans le milieu utilisé pour le test, à l'aide d'une pipette multicanaux. Chaque puits a été homogénéisé par pipetage en va-et-vient (une dizaine par puits). Des gouttes de 10 μ l ont ensuite été déposées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture gélosé (l'Hépès est remplacé par de l'Agar dans le cas du MM). Chaque boîte a été répétée trois fois en conditions stériles. Les boîtes ont été placées en chambre lumineuse (30°C) pendant une dizaine de jours pour *Synechocystis* et dans l'incubateur à 37 °C pendant 24 h pour *E. coli*.

Précautions importantes :

- Veiller à utiliser des plaques 96 puits stériles mais non traitées pour cultures cellulaires (le produit utilisé pour traiter les plaques est probablement un antibactérien car il entraîne de très fortes mortalités).
- Bien sécher (30 min à 1 h dans une hotte à flux laminaire) les boîtes de Pétri contenant les milieux gélosés afin d'éviter que l'humidité du milieu ne provoque le mélange accidentel de gouttes.

V.5.2 Test de survie : dénombrement de colonies (CFU)

Les cultures de *Synechocystis* et d' *E. coli* ont été lavées 3 fois dans leur milieu test (voir II.3.3) puis aliquotées en fractions de 2 mL dans des tubes en plastique (Marque Falcon) de 12 mL.

A chaque fraction ont été ajoutés 100 µL du toxique étudié (dilutions de solutions de nanoparticules, filtrat de nanoparticules, solutions de nitrate de cérium,...préalablement stérilisés par filtration sur filtre 0,22 µm) ou 100 µL d'eau ultrapure stérile pour la fraction témoin. Toutes ces opérations sont effectuées en conditions stériles (hotte à flux laminaire). Les tubes contenant les suspensions cellulaires ont ensuite été placés dans leurs incubateurs agités respectifs pendant un temps donné (en général 3 h).

A la fin de cette période d'incubation, 100 µL de chaque condition ont été prélevés et dilués successivement de 10 en 10 dans des eppendorfs de 2 mL contenant 900 µl du milieu dans lequel a été réalisé le test (eau, milieu de culture...). Chaque dilution a été vortexée plusieurs fois avant d'être utilisée pour la dilution suivante (cette étape a permis d'homogénéiser les suspensions et d'obtenir des cellules bien individualisées). Les deux voire trois dernières dilutions de chaque série ont ensuite été étalées à l'aide d'un râteau métallique sur boîtes de Pétri contenant du milieu de culture gélosé (100 µL par dilution déposés par boîte). Chaque dilution a été étalée au minimum trois fois en conditions stériles.

Les boîtes ont ensuite été placées dans leurs incubateurs respectifs (même protocole que pour le test de survie en gouttes). Les colonies ont ensuite été comptées et rapportées au nombre de colonies comptées sur le témoin pour en déduire le pourcentage de cellules ayant survécu au toxique testé. Le résultat et l'erreur sur le comptage ont été obtenu sur la moyenne des trois voire six boîtes étalées par dilution. Chaque test a été répété minimum trois fois en condition stérile (hotte à flux laminaire et bec Bunsen).

Précautions importantes :

- Trois à six boîtes étant nécessaires par concentration testée, ce protocole entraîne souvent des décalages chronologiques importants entre la première et la dernière boîte étalée. Il a donc été nécessaire de fractionner ces tests en plusieurs groupes comprenant chacun au maximum trois concentrations en toxique différentes ainsi

qu'un témoin. Le décalage dans le temps (et donc la différence de temps d'incubation) entre la première et la dernière boîte étalées de chaque groupe a ainsi pu être limité.

- Pour étaler les gouttes de dilution sur les boîtes de Pétri il est préférable d'éviter l'utilisation de billes de verre (bien que plus pratiques que le râteau métallique). En effet, la présence de nanoparticules lors de la réalisation de ces tests et leur grande affinité pour le verre risqueraient de fausser les résultats.
- Les cônes de pipette en plastique de marque Sorenson ne peuvent être utilisés que pour *Synechocystis*. Pour *E. coli* il vaut mieux utiliser des cônes de marque Biostark. En effet, la souche que nous avons utilisée d'*E. coli* a tendance à adhérer aux cônes Sorenson provoquant ainsi une baisse de reproductibilité des tests de survie.

V.5.3 Test d'intégrité membranaire (LIVE/DEAD)

Les cultures de *Synechocystis* et d'*E. coli* ont été cultivées classiquement puis aliquotées en fractions de 100 μ L dans des plaques 96 puits. L'ajout des nanoparticules (filtrat ou eau) a été réalisé par l'addition de 5 μ L du toxique à tester aux 100 μ L de cultures. Les cultures ont été homogénéisées par va-et-vient à la pipette. Chaque plaque contenait trois répétitions d'une même condition ainsi que le témoin (eau ultrapure remplaçant le toxique) également répété trois fois. Les plaques multipuits ont ensuite été mises à incuber dans les incubateurs appropriés aux deux microorganismes. A la suite de la durée d'incubation (en général de 3 h), un mélange des deux colorants du test LIVE/DEAD[®] (L7007 BacLight[™] Bacterial Viability Kits, Invitrogen) a été préparé et maintenu à l'obscurité. Pour un test utilisant une plaque multipuits, 100 μ L du mélange LIVE/DEAD (3 μ L du composé A et 3 μ L de composé B pour 1 mL d'eau ultrapure stérile) ont été ajoutés aux 100 μ L de culture contenus dans chaque puits, puis homogénéisés à la micropipette. Pour *E. coli*, les cultures ont dû préalablement être diluées 20 fois (5 μ L de culture dans 95 μ L d'eau) avant ajout du mélange LIVE/DEAD.

L'homogénéisation a été réalisée sur plaque mécanique agitée pendant 15 min dans le noir. A l'issue de cette homogénéisation, les plaques ont été lues sur un fluoromètre Spectra Max M2 – Molecular Devices. La longueur d'onde d'excitation était de 485 nm et les longueurs d'ondes d'émission mesurées de 530 et 630 nm. Le ratio $Em(530\text{ nm})/Em(630\text{ nm})$ a été calculé et comparé à celui du témoin sans toxique. Le rapport de ces valeurs correspond au pourcentage de cellules qui ont survécu au toxique.

Une série d'expérience a également été réalisée dans des cellules de spectroscopie en quartz de 2 mL. Le ratio culture / mélange fluorescent était de 2 mL pour 300 μ L. Le mélange LIVE/DEAD étant composé de 4,8 μ L de composé A et 4,8 μ L de composé B pour 1 mL d'eau ultrapure stérile. Les mesures ont été réalisées sur un fluoromètre Varian Cary Eclipse à une longueur d'onde d'excitation de 470 nm et l'enregistrement des longues d'ondes d'émission comprises entre 490 et 700 nm (mode scan slow).

V.5.4 Métabonomique

La préparation des échantillons pour l'analyse métabonomique se décline en 3 phases principales: l'extraction des métabolites, l'analyse en RMN- ^1H et le traitement des données par analyses statistiques.

- **Extraction des métabolites**

Une suspension de nanoparticules de CeO_2 à 10 g/L a été préparée 24h avant l'extraction. Le jour même, un aliquot de cette suspension a été ultrafiltré (filtre 10 kDa de Millipore) afin d'en isoler le filtrat. Puis un aliquot du filtrat ainsi que de la suspension de nanoparticules ont été dilués 10 fois afin d'obtenir la série de suspensions suivantes :

- A. Suspension de nanoparticules de CeO_2 à 10 g/L
- B. Suspension de nanoparticules de CeO_2 à 1 g/L
- C. Filtrat de la suspension de nanoparticules à 10 g/L
- D. Filtrat de la suspension de nanoparticules à 1 g/L.

Les expériences ont été réalisées sur une culture d'*E. coli* (RR1) préparée classiquement la veille dans du milieu de culture LB et lavée trois fois dans l'eau ultrapure avant la mise en contact. La suspension cellulaire (de densité optique de 2,07) a été aliquotée en 16 fractions de 40 mL dans des tubes en plastique (Falcon). Les aliquots de culture ont été répartis en 4 séries de 4 répétitions d'échantillons de compositions suivantes :

- Série « CeO_2 100 ppm », échantillons 1, 2, 3 et 4 : Ajout de 400 μ L de A
- Série « CeO_2 10 ppm », échantillons 5, 6, 7 et 8 : Ajout de 400 μ L de B
- Série « Filtrat 100 ppm », échantillons 9, 10, 11 et 12 : Ajout de 400 μ L de C
- Série « Filtrat 10 ppm », échantillons 13, 14, 15 et 16 : Ajout de 400 μ L de D.

Les cultures ont été placées à l'incubateur à 37 °C pendant 3h. A la suite de cette période d'incubation, les suspensions cellulaires ont été centrifugées 5 min à 4500 G et les culots resuspendus dans 5 mL d'acide perchlorique 0,1 %. Les suspensions ont été mises à ébullition pendant 5 min afin de permettre la lyse cellulaire et la libération des métabolites. Cette méthode de lyse par l'acide perchlorique s'est révélée plus efficace que les méthodes de lyse cellulaire par alternance de congélation-décongélation à l'azote liquide.

Les suspensions ont de nouveau été centrifugées 5 min à 4500 G afin de séparer les métabolites hydrosolubles (présents dans le surnageant) des autres extraits cellulaires, susceptibles de compliquer l'analyse des spectres RMN. Les extraits cellulaires hydrosolubles n'ont pas été concentrés par lyophilisation car cette étape provoquait des diminutions de la reproductibilité des résultats (probablement due à une remise en suspension incomplète). Ils ont été conservés à 4°C jusqu'à leur analyse par RMN.

- **Analyse RMN-¹H**

Pour chaque échantillon, 540 µL de surnageant ont été introduits dans des tubes HL5-7, distribués par CortecNet. 60 µL d'eau deutérée ont été ajoutés pour les besoins de la RMN ("lock" du signal, optimisation de l'homogénéité du champ magnétique). Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker DRX 600 de champ magnétique de 14,1 T, à 293K. La séquence employée permet d'obtenir, après excitation par une impulsion 90°, le signal des métabolites en atténuant autant que possible le signal du solvant aqueux, de l'ordre de 10⁵ fois plus intense, au moyen d'un ensemble d'impulsions sélectives et de gradients destinés à défocaliser sélectivement le signal intense. Chaque spectre consiste en 512 acquisitions de 2,2 secondes, centrées à 4,8 ppm et de largeur spectrale 18 ppm.

A l'aide du logiciel Topspin (Bruker), les spectres subissent ensuite une transformée de Fourier, une correction manuelle de leur phase et une correction polynomiale de la ligne de base.

- **Traitements des données**

Les spectres ont été intégrés par pas de 0,05 ppm. Ces intervalles sont relativement larges mais permettent de limiter les effets de déplacement chimique dus aux variations de pH tout en restant suffisamment étroits pour conserver suffisamment d'informations pertinentes. Les données ont ensuite été traitées par analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel SIMCA.

1. Identification du gène à muter par délétion :

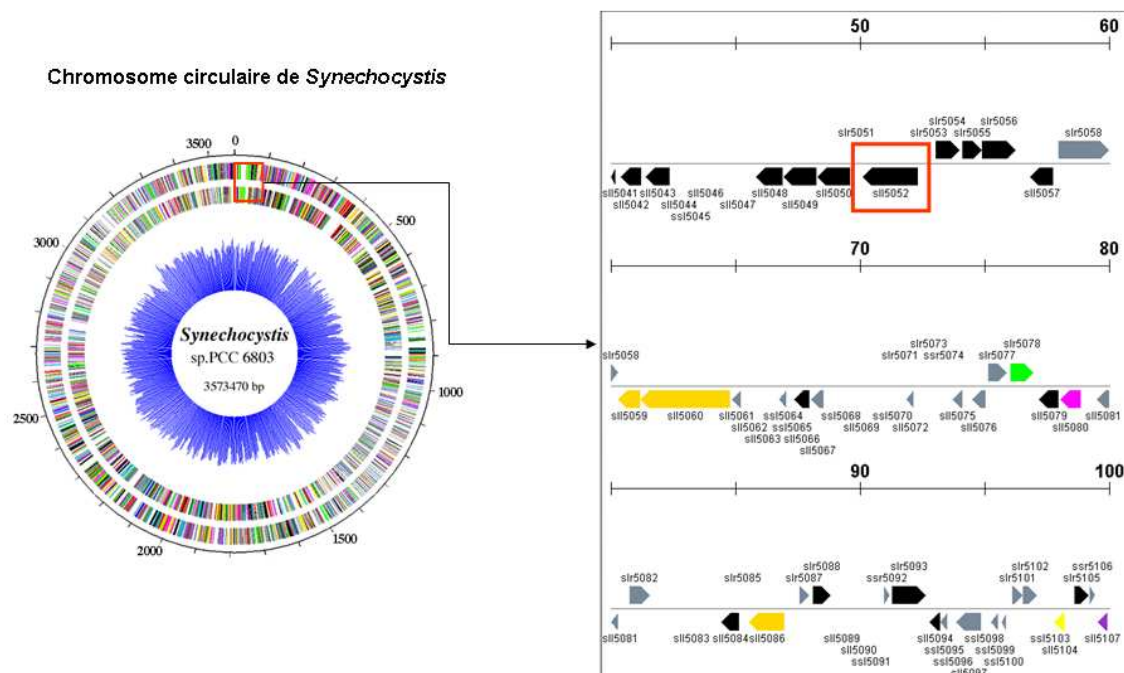


Figure 57 Construction des mutants, étape 1.

V.5.5 Construction des mutants

La construction des mutants s'effectue en de multiples étapes: choix des gènes à muter, construction des oligonucléotides, construction de la cassette de délétion, ligation de la cassette avec un plasmide, amplification du plasmide, digestion du plasmide, transformation du plasmide, vérification de la ségrégation et vérification de la construction par séquençage.

Quelques protocoles sont communs à plusieurs étapes :

- **Amplification d'ADN par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)**

La PCR a été utilisée pour amplifier les gènes analysés, construire les cassettes pour leur inactivation et vérifier leur séquence ainsi que leur intégration dans le génome de *Synechocystis* au niveau des gènes à inactiver.

Le mélange de réaction suit le protocole fourni par le fabricant de la Taq polymérase Invitrogen® qui sert à la PCR. Exemple des proportions de mélange pour une PCR de 100µL :

- Tampon Tp (x10) : 10 µL
- MgCl₂ (50 mM) : 3 µL
- Nucléotides triphosphates dNTP (25 mM) : 0,8 µL
- Oligonucléotide amorce 1 : 50 pmol
- Oligonucléotide amorce 2 : 50 pmol
- Enzyme polymérase (Taq) : 1-2 U
- ADN matrice : plasmide : 1-10 ng, ADN génomique : 10 à 100 ng
- Eau : compléter jusqu'à 100 µL

Dans le cas de la PCR sur colonies de *Synechocystis*, une étape préalable est nécessaire pour fragiliser les membranes et libérer l'ADN génomique : une suspension cellulaire est congelée pendant 15 min dans l'azote liquide, chauffée pendant 15 min au bain-marie à 95 °C puis centrifugée. 10 µL du surnageant des cultures sont prélevés et ajoutés à 40 µL du mélange PCR.

- **Purification de l'ADN et des produits PCR**

Les produits PCR et ADN sont purifiés sur colonnes d'après le protocole fourni par NucleoSpin® Extract II Kit (Clontech). L'ADN est déposé sur la membrane de silice de la colonne. Les contaminants (sels, macromolécules solubles) sont retirés par des étapes de

2. Construction d'une cassette de délétion :

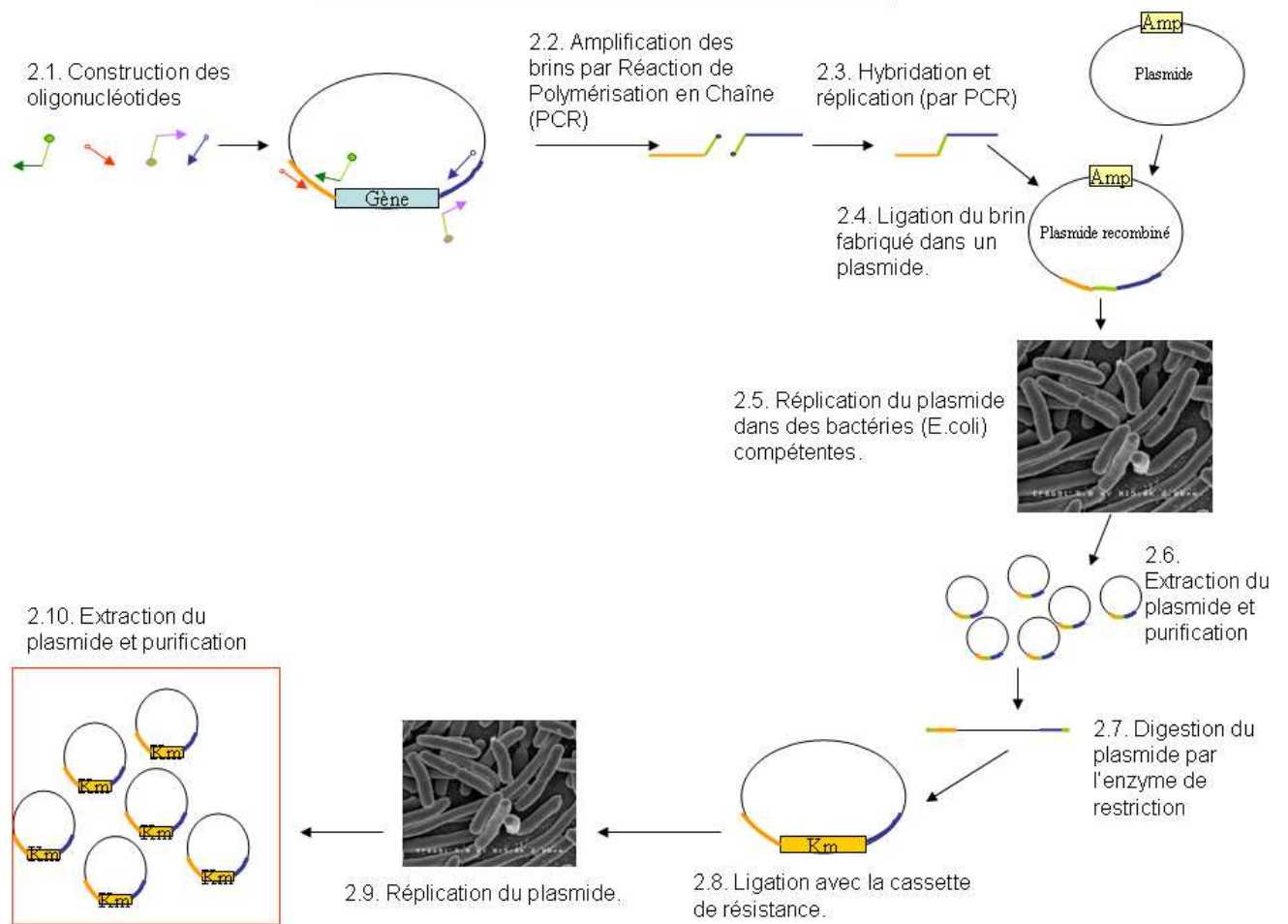


Figure 58 Construction des mutants, étape 2. Construction de la cassette de délétion.

lavage avec des tampons contenant de l'éthanol. L'ADN pur est finalement élué par lavages et centrifugation dans un tampon légèrement alcalin de faible force ionique (5 mM Tris-Cl, pH=8,5).

Le kit NucleoSpin® (Clontech) a été utilisé pour préparer de l'ADN plasmidique directement à partir de cultures bactériennes. Les cellules d'*E. coli* sont préalablement mises en culture la veille, puis 2 mL de culture sont centrifugés afin de ne conserver que le culot de cellules. La lyse bactérienne se fait par ajout d'un tampon alcalin (contenant du SDS), puis la précipitation des parois et membranes de l'ADN génomique est obtenue par centrifugation. Le surnageant est transféré dans une colonne NucleoSpin qui contient une membrane de silice. L'ajout d'un tampon contenant un sel chaotrope conduit à l'adsorption de l'ADN plasmidique sur la membrane. Après plusieurs étapes de lavage pour retirer les contaminants (ex : protéine, ARN), l'ADN plasmidique est élué à l'aide d'un tampon Tris (pH=8-8,5). (protocole Clontech).

- **Resuspension et dosage des acides nucléiques**

Les fragments PCR, plasmides et préparation d'ARN sont resuspendus dans un tampon T0,1E ([Tris HCl]₁=10 mM, pH=7,5 ; [EDTA]=0,1mM). La quantité d'ADN est déterminée en mesurant la DO à 260 nm (pour l'ADN : 1 unité de DO correspond à 50 µg/mL d'ADN). Le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} permet de déterminer la contamination de la préparation. Il doit être égal à 1,8 pour une mesure d'ADN.

V.5.5.1 Construction de la cassette de délétion

La construction de la cassette de délétion (Figure 58) commence par le choix des oligonucléotides amonts et avals utilisés pour la « PCR reconstitution ». Ceux-ci sont construits à partir de la séquence des parties flanquantes du gène (c'est-à-dire 300 paires de bases avant et 300 paires de bases après le gène) et d'enzymes de restriction. SmaI est l'enzyme de restriction choisie pour la construction de la cassette de délétion de *slr1875* ; elle est remplacée par StuI pour cassette de délétion de *sls1052* car SmaI est déjà présente dans ce gène. Quatre oligonucléotides différents sont nécessaires par gène délété :

- oligonucléotide sens pour amplifier la séquence amont du gène

- oligonucléotide antisens + enzyme de restriction pour amplifier la séquence amont du gène
- oligonucléotide sens + enzyme de restriction pour amplifier la séquence en aval du gène
- oligonucléotide antisens pour amplifier la séquence en aval du gène.

Les brins obtenus (parties flanquantes contenant les enzymes de restriction) sont répliqués par PCR à partir d'ADN génomique de *Synechocystis* et des oligonucléotides. L'hybridation des brins (jonction des deux brins encadrant le gène) est obtenue par PCR. A l'issue de la PCR, on vérifie la taille et la séquence de la cassette de délétion.

- **Ligation avec un plasmide et amplification**

La ligation de la cassette de délétion dans un plasmide est effectuée avec le kit « pGEM-T Vector System » de Promega par PCR en suivant les indications du fournisseur. 1 μL du produit de ligation est ensuite utilisé pour transformer 50 μL d'*E. coli* Top10 électrocompétentes. L'électroporation (opération qui permet de faire passer le plasmide dans les bactéries électrocompétentes sous l'action d'un champ électrique) s'effectue à 2,5 kV pendant 5,4 s puis les cellules sont resuspendues dans 300 à 400 μL de milieu SOC (pour 1ml : 2 g Bactotryptone, 0,5 g Yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM glucose).

Les cellules sont ensuite mises en culture sur boîtes LB-Amp (0,1 g/L d'ampicilline). Le plasmide à multiplier contenant une cassette de résistance à l'ampicilline, seules les bactéries ayant intégré le plasmide pourront se développer. Les colonies qui ont poussé sur LB-Amp sont récoltées après une nuit à 37 °C.

Les plasmides sont extraits, purifiés et quantifiés.

- **Digestion du plasmide puis ligation avec la cassette Km**

La digestion (obtention d'un plasmide linéaire) est obtenue par utilisation de l'enzyme de restriction SmaI pour l'inactivation de slr1875 et StuI pour celle de sll50052. Une unité d'enzyme est utilisée par μg d'ADN plasmidique. Les fragments subissent ensuite une étape de ligation avec la cassette de résistance à la kanamycine (Km). Il faut 3 μL d'antibiotique (Kanamycine) pour 12 μL du mélange de ligation (4,4 μL Tp (x10 ligase), 3-4 μL plasmide, 24-25 μL eau, 4,4 μL ligase). Les plasmides obtenus sont des plasmides circulaires qui

3. Transformation dans *Synechocystis*

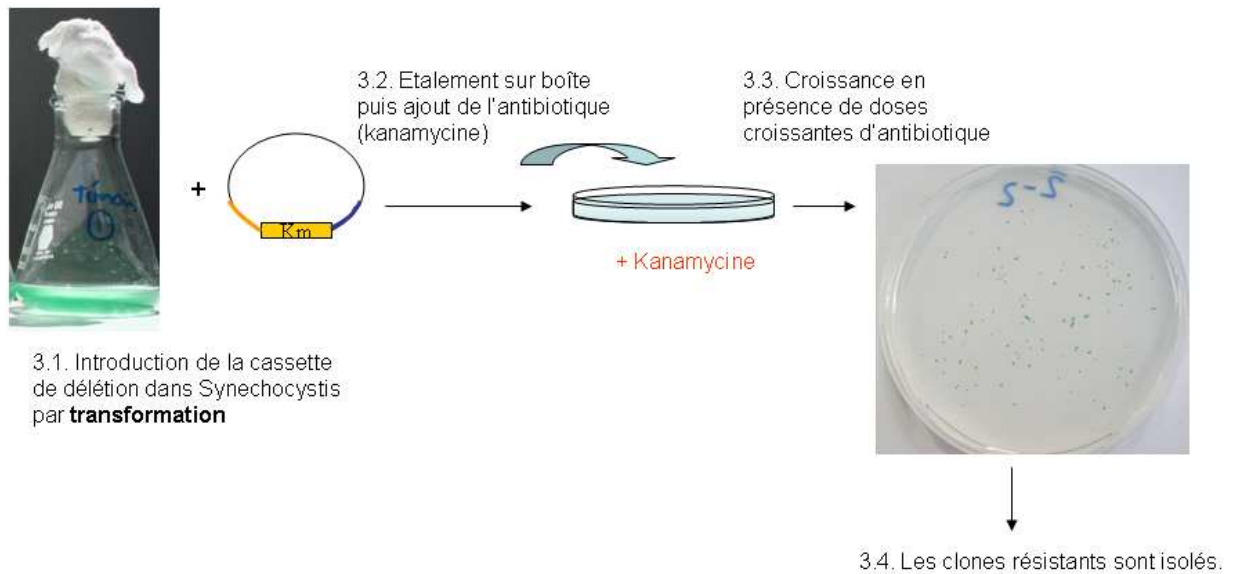


Figure 59 Construction des mutants, étape 3. Transformation dans *Synechocystis*.

4. Vérification des séquences et du phénotype

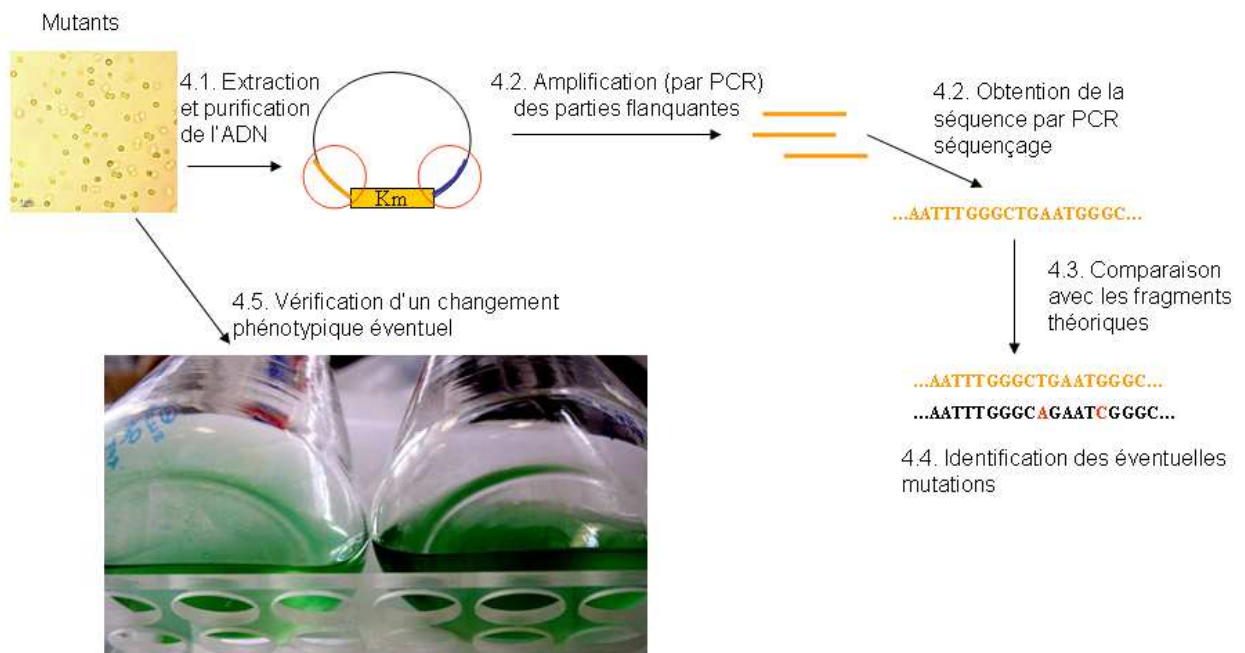


Figure 60 Construction des mutants, étape 4. Vérification de la construction par séquençage.

contiennent la cassette de délétion qui porte le gène de résistance Km flanqué de part et d'autre par les séquences encadrant le gène à supprimer. Les plasmides sont extraits, purifiés puis amplifiés dans des *E. coli* électrocompétentes (protocole décrit plus haut). La sélection des clones se fait par culture sur des boîtes LB-Km.

V.5.5.2 Transformation dans *Synechocystis*

Cinquante millilitres d'une culture de *Synechocystis*, préalablement cultivée trois fois en phase exponentielle, sont centrifugés à 4500 g pendant 10 min puis resuspendus dans 5-10 mL de milieu MM propre. Cette opération est répétée trois fois, puis la culture est aliquotée en fractions de 1 mL. L'ADN est préparé par ajout de 1 µg d'ADN plasmidique dans 100 µL de tampon T0,1E. Ce mélange est ensuite ajouté à la culture de *Synechocystis* (100 µL de mélange pour 1 mL de culture). Après vortexage, les cultures sont mises à incuber pendant 1h30 en chambre lumineuse à 30°C, 3000 lux, puis 0,1 mL de culture est déposé sur boîtes MM (Figure 59). Après une nuit d'incubation, 0,4 mL d'une solution de Km à 4 mg/mL sont déposés sous l'agar à l'aide d'une spatule et d'une micropipette. Ainsi l'antibiotique diffuse lentement à travers le milieu gélosé permettant aux cellules transformées d'avoir le temps d'exprimer leur résistance à la Km. Dans le cas d'une sélection trop rapide, les cellules sauvages mais également les transformants seraient tués. Les boîtes sont mises à incuber à 3000-3500 lux, les clones sont visibles au bout d'une dizaine de jours (Figure 59). Les clones sont ensuite fréquemment resuspendus dans de l'eau. Un aliquot est analysé par PCR et l'autre est redéposé sur boîtes MM contenant des concentrations croissantes en Km (jusqu'à 300 µg/mL pour avantager la réplication des copies mutantes de chromosome au détriment des copies sauvages), des clones Δ sl15052 et Δ slr1875 sont obtenus. Le sens d'intégration de la cassette Km et la bonne ségrégation sont vérifiés par extraction de l'ADN puis PCR (utilisation d'un tampon favorisant la réplication des brins longs, Tp enhancer) sur la partie mutée (Figure 60).

V.5.5.3 Séquençage

Les réactions de séquençage ont été réalisées en suivant le protocole de séquençage par fluorescence avec le Big-Dye Terminator 3.1 (Perkin Elmer®). Cette étape nécessite un ADN très propre et une précipitation dans l'alcool absolu. Les séquences (brins de part et d'autre de la cassette) ont été vérifiées sur deux mutants par mutation et analysées à l'aide du programme Sequencher.

V.5.6 Extraction et analyse des exopolysaccharides

Les exopolysaccharides ont été obtenus à partir des cultures cellulaires repiquées trois fois en phase exponentielle dans le MM pour la souche sauvage et avec addition de kanamycine pour les souches mutantes. La récolte s'effectue une semaine après le dernier repiquage (DO~2) par centrifugation des cultures à 25000 g pendant 15 min. Les surnageants sont prélevés (environ 100 mL par culture) puis placés dans des erlens sous hotte à 50°C afin de réduire leur volume environ 10 fois. Puis 60 mL d'éthanol absolu à 4°C sont ajoutés aux surnageants (dont il reste environ 10 mL). Les erlens sont ensuite placés en chambre froide (6°C) pendant 30 min pour permettre la précipitation des EPS. Les solutions sont alors centrifugées à 4500 g à 4°C pendant 30 min. Après retrait des surnageants, les culots sont resuspendus dans l'eau ultrapure puis dialysés dans des cassettes de dialyse 3,5 kDa de 12 mL contre 250 mL d'eau ultrapure pendant une semaine (l'eau est changée 3 fois pendant la semaine). Les solutions dialysées sont ensuite lyophilisées. Le rendement d'extraction est de 6-7 mg d'EPS pour 100 mL de culture pour la souche sauvage et de 4-5 mg pour les souches mutées.

Les EPS lyophilisés ont été analysés directement sous forme solide par infrarouge à réflexion totale atténuée (IR- ATR) sur un spectromètre Perkin Elmer Spectrum FT-IR One. Les bandes d'adsorption sont données en transmission en fonction de la longueur d'onde (en cm^{-1}).

V.6 Références bibliographiques

- [Bailey *et al.*, 2003] Bailey, N. J. C., Oven, M., Holmes, E., Nicholson, J. K., and Zenk, M. H. (2003). Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via H^1 NMR spectroscopy and chemometrics. *Phytochemistry*, 62(6):851–858.
- [Benning *et al.*, 2004] Benning, L. G., Phoenix, V. R., Yee, N., and Tobin, M. J. (2004). Molecular characterization of cyanobacterial silicification using synchrotron infrared micro-spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(4):729–741.
- [Bon, 2007] Bon, D. (2007). *Evaluation de deux nouveaux outils pour l'étude d'échantillons biologiques par Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire : La RMN HR-MAS et la Métabonomique*. PhD thesis, Université de Toulouse.
- [Brayner *et al.*, 2006] Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., and Fievet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, 6(4):866–870.
- [Chauvierre *et al.*, 2003] Chauvierre, C., Labarre, D., Couvreur, P., and Vauthier, C. (2003). Radical emulsion polymerization of alkylcyanoacrylates initiated by the redox system dextran-cerium(iv) under acidic aqueous conditions. *Macromolecules*, 36:6018–6027.
- [Crawford, 1989] Crawford, I. P. (1989). Evolution of a biosynthetic-pathway, the tryptophan paradigm. *Annual Review of Microbiology*, 43:567–600.
- [Dubois *et al.*, 1956] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3):350–356.
- [Ducruix *et al.*, 2008] Ducruix, C., Vailhen, D., Werner, E., Fievet, J. B., Bourguignon, J., Tabet, J. C., Ezan, E., and Junot, C. (2008). Metabolomic investigation of the response of the model plant *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure: Evaluation of data pretreatment methods for further statistical analyses. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 91(1):67–77.
- [Fan, 1996] Fan, W. M. T. (1996). Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28:161–219.

- [Foster, 2004] Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11):898–907.
- [Gartland *et al.*, 1991] Gartland, K. P. R., Beddell, C. R., Lindon, J. C., and Nicholson, J. K. (1991). Application of pattern-recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear-magnetic-resonance spectroscopy of urine. *Molecular Pharmacology*, 39(5):629–642.
- [Hesse *et al.*, 1997] Hesse, M., Meier, H., and Zeeh, B. (1997). *Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique*. Masson.
- [Kaudewitz, 1963] Kaudewitz, F. (1963). Lethality and inactivation after treatment of *Escherichia coli*-cells with nitrous acid. *biochemical and biophysical research communications*, 11(5):416–&.
- [Kotnik *et al.*, 2007] Kotnik, M., Anderluh, P. S., and Prezelj, A. (2007). Development of novel inhibitors targeting intracellular steps of peptidoglycan biosynthesis. *Current Pharmaceutical Design*, 13(22):2283–2309.
- [Luikenhuis *et al.*, 1998] Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular Biology Of The Cell*, 9(5):1081–1091.
- [Moreau *et al.*, 2007] Moreau, J. W., Weber, P. K., Martin, M. C., Gilbert, B., Hutcheon, I. D., and Banfield, J. F. (2007). Extracellular proteins limit the dispersal of biogenic nanoparticles. *Science*, 316(5831):1600–1603.
- [Panoff, 1989] Panoff, J.-M. (1989). *Les exopolysaccharides de deux cyanobactéries. Synechocystis PCC6803 et 6714 : Etudes physiologiques, biochimique et génétique*. PhD thesis, Université Aix-Marseille.
- [Panoff *et al.*, 1988] Panoff, J.-M., Priem, B., Morvan, H., and Joset, F. (1988). Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* pcc 6803 and 6714. *Arch Microbiol*, 150:558–563.
- [Pereira *et al.*, 2005] Pereira, G. E., Gaudillere, J. P., Van Leeuwen, C., Hilbert, G., Lavialle, O., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., and Rolin, D. (2005). H-1 NMR and chemometrics to characterize mature grape berries in four wine-growing areas in bordeaux, france. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16):6382–6389.

- [Reddy *et al.*, 2007] Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C., and Punnoose, A. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*, 90(21):213902.
- [Sehgal *et al.*, 2005] Sehgal, A., Lalatonne, Y., Berret, J. F., and Morvan, M. (2005). Precipitation-redispersion of cerium oxide nanoparticles with poly(acrylic acid): Toward stable dispersions. *Langmuir*, 21(20):9359–9364.
- [Worle-Knirsch *et al.*, 2006] Worle-Knirsch, J., Pulskamp, K., and Krug, H. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters*, 6(6):1261–1268.

Résumé des principaux résultats du chapitre V :

Différents mécanismes de toxicité.

Dans cette section, les différents mécanismes de toxicité des NPs de CeO₂ vis à vis des cultures de Synechocystis et E. coli ont été étudiés.

- **Toxicité indirecte engendrée par les NPs**

Dans le milieu de culture (MM), les NPs de CeO₂ ne provoquent aucune baisse de la survie chez Synechocystis. En revanche, dans l'eau, la survie atteint un plateau à 20 % pour des concentrations supérieures à 15 ppm de CeO₂. Nous avons démontré que la mortalité observée n'est pas directement due aux NPs mais à l'acide nitrique contenu dans leurs suspensions. Le plateau de survie à 20 % est attribué à une sous-population résistante à l'acide nitrique.

- **Toxicité directe engendrée par des NPs**

De même que pour Synechocystis, les NPs de CeO₂ ne provoquent aucune baisse de la survie chez E. coli dans le milieu de culture (LB). En revanche une forte toxicité est observée dès les faibles doses (DL50 : 7ppm) en NPs dans l'eau ultrapure. Le filtrat des NPs jouant un rôle mineur dans cette toxicité, celle-ci est attribuée aux nanoparticules.

- **Métabonomique**

Des analyses par RMN des métabolites d'E. coli confirment que la toxicité des NPs est différente de celle simplement provoquée par leur filtrat. Elles orientent les soupçons vers des mécanismes de toxicité impliquant notamment la biosynthèse des sucres et des acides gras et les voies métaboliques de transport des ions transmembranaires, de résistance à l'acidité et de synthèse des lipopolysaccharides et peptidoglycanes.

- **Mutants d'EPS**

Des mutants de Synechocystis dépourvus d'EPS auraient permis de vérifier le rôle « protecteur » joué par les EPS chez les microorganismes qui les possèdent. Ces constructions génétiques n'ont pour l'instant conduit qu'à des mutants portant des EPS différents de ceux de la souche sauvage mais qui interagissent cependant différemment avec les NPs.

Conclusion et perspectives

Le devenir à grande échelle des nanoparticules manufacturées dans l'environnement ne peut être appréhendé sans des recherches en amont sur les mécanismes d'interactions physicochimiques et biologiques à l'échelle de la nanoparticule et des microorganismes. Lorsque ces recherches, auxquelles le travail présenté ici participe, auront fourni les réponses aux mécanismes d'interaction observés in-vitro puis in-vivo, on pourra espérer anticiper et minimiser les conséquences environnementales d'un accroissement important de l'utilisation des nanoparticules.

Dans cette optique, nous avons exploré les différents paramètres susceptibles de jouer sur les interactions des nanoparticules (plus particulièrement les NPs de CeO_2) avec le vivant. L'importance des paramètres physicochimiques, notamment l'état de stabilité et de surface des nanoparticules lors des incubations avec des cellules, a été mise en exergue.

Grâce aux deux modèles biologiques étudiés, l'entérobactérie *E. coli* (bactérie des intestins des mammifères) et la cyanobactérie *Synechocystis* (appartenant au phytoplancton qui contribue au maintien de la biosphère), nous avons constaté l'importance de la structure extracellulaire dans ce type d'interactions. En effet, les exopolysaccharides synthétisés par *Synechocystis* constituent une barrière efficace entre les nanoparticules et la paroi cellulaire. Ceux-ci ne protègent cependant pas *Synechocystis* contre la floculation provoquée par les nanoparticules. Nous avons en effet démontré que plus la quantité de nanoparticules adsorbées est importante, plus l'épaisseur de la couche de polymères (EPS) diminue et la mobilité électrophorétique des cellules augmente. La sédimentation de microorganismes photosynthétiques résultant de cette floculation aurait de graves conséquences dans un milieu environnemental où ces derniers constituent une grande partie de la biomasse aquatique pour la chaîne alimentaire et contribuent au renouvellement de l'oxygène de l'atmosphère. En revanche, pour *E. coli* dans le milieu de culture LB, aucune floculation n'est observée. Les molécules organiques chargées négativement du milieu LB provoquent une passivation des nanoparticules en s'adsorbant à leur surface. Dans l'environnement, la floculation des nanoparticules avec des molécules organiques naturelles (dont les EPS font partie) permet la déstabilisation des nanoparticules mais également leur entrée dans la chaîne alimentaire

Tableau récapitulatif des interactions avec les nanoparticules de CeO_2 :

		<i>Escherichia coli</i>		<i>Synechocystis</i> PCC6803	
		Milieu de culture (LB)	Eau ultrapure	Milieu de culture (MM)	Eau ultrapure
Paramètres	Présence d'EPS	0	0	+	+
	Lumière pendant les tests	0	0	+	+
Résultats	Floculation en présence de NPs	0	+	+	+
	Mortalité due aux NPs	0	++	0	0
	Mortalité due aux filtrats des NPs	0	+	0	++
	Phénomènes RedOx	++	0	+	0

aquatique en se liant aux nutriments. Malgré la présence des EPS, l'incubation de cellules de *Synechocystis* dans l'eau avec des NPs de CeO_2 montre une certaine toxicité. Nous avons démontré que cette toxicité n'est pas provoquée par les nanoparticules en elles-mêmes mais par l'acide nitrique utilisé lors de la synthèse de ces dernières. En effet, la présence d'un tampon (même en faible concentration) suffit à éliminer la toxicité observée.

En revanche, la mortalité des bactéries d'*E. coli* dans l'eau en présence de nanoparticules de CeO_2 est trop importante pour résulter d'un simple effet de l'acidité. Des expériences de métabonomiques par RMN montrent que les voies métaboliques touchées lors d'une incubation en présence de nanoparticules sont différentes de celles touchées par une incubation avec simplement le filtrat de ces nanoparticules. Une perspective de ce travail sera d'approfondir les analyses métabonomiques réalisées en RMN en les couplant par exemple avec des analyses en spectrométrie de masse et en faisant varier les temps d'incubation.

Les images en microscopie électronique et la construction d'une isotherme d'adsorption révèlent la formation d'une monocouche de nanoparticules à la surface des bactéries d'*E. coli*. Cependant, aucune trace de cérium n'est trouvée à l'intérieur des cellules (chez *E. coli* et *Synechocystis*) par spectrométrie EDX, ce qui confirme la non-pénétration du cérium sous forme nanoparticulaire ou ionique.

Les expériences de spéciation des nanoparticules de CeO_2 , après incubation en présence des cellules dans l'eau ultrapure, ne montrent aucune réduction des nanoparticules. Cette observation permet de conclure que les nanoparticules de CeO_2 ne provoquent pas d'oxydation des membranes bactériennes, contrairement à ce qui a été montré dans d'autres études pour des bactéries *E. coli* ayant incubé avec des nanoparticules de TiO_2 . En effet, des analyses de surface montrent que, si le cœur des nanoparticules est constitué d'atomes de cérium au degré d'oxydation 4, la couche externe des nanoparticules est formée par des atomes au degré d'oxydation 3. Or cet élément a un potentiel électrique trop élevé pour réagir avec les molécules qui constituent la paroi bactérienne. Néanmoins, nous observons une réduction des nanoparticules ayant incubé avec les cellules dans leur milieu de culture. Cette réduction, plus marquée dans le cas d'*E. coli*, ne provoque pas de mortalité bactérienne. Elle est donc vraisemblablement la résultante d'un piégeage, au cœur des nanoparticules, de radicaux libres produits naturellement par les cellules dans leur milieu de culture. Cette observation est en accord avec des études récentes tendant à prouver un effet bénéfique de

nanoparticules de CeO_2 sur la durée de vie de neurones par le piégeage de radicaux libres. Afin de confirmer cette hypothèse, une perspective de ce travail serait de doser les espèces radicalaires oxydantes présentes dans les cultures cellulaires en fonction de la concentration et du type de nanoparticules.

Dans l'environnement, le danger des nanoparticules résiderait donc plus dans les effets physicochimiques qu'elles provoquent que dans une toxicité réelle. Dans le but de comprendre et anticiper les interactions physicochimiques avec les nanoparticules, la comparaison de microorganismes recouverts d'exopolymères différents en abondance et en composition (notamment par la construction de mutants) représentera une avancée importante pour ce type d'étude. La caractérisation complète des EPS des mutants obtenus au cours de ce travail, ainsi que la construction de nouveaux mutants aux EPS très diversifiés en composition et en quantité représentent donc une autre perspective de cette thèse.

La majeure difficulté de l'étude de la toxicité des nanoparticules réside dans leur comportement, face aux analyses, très différent des toxiques classiques. En effet, comme nous l'avons vu elles peuvent provoquer des interférences dans les tests impliquant des dénombrements de colonies (division cellulaire accélérée et floculation bactérienne) ou les tests utilisant des marqueurs fluorescents (risque de fluorescence parasite des NPs et limitation de l'entrée des marqueurs fluorescents dans les cellules). Les méthodes et protocoles d'évaluation de la toxicité doivent donc être réévalués et pensés de manière totalement différente. Les connaissances acquises, au cours de cette thèse, pour les nanoparticules de CeO_2 , nous permettent à présent d'envisager d'élargir les recherches à des nanoparticules différentes en composition, forme, taille et chimie de surface.

On comprend toute l'importance de recherches couplant à la fois l'étude des interactions physicochimiques, trop souvent négligées dans les tests de « nanotoxicité » réalisés classiquement, et l'étude des mécanismes de toxicité biologiques. L'approche multidisciplinaire et multiparamètre de ce type de travaux est d'une grande complexité mais un passage obligé pour la compréhension des interactions entre cellules et nanoparticules.

Tables des matières des figures

Figure 1 Illustration de la structure d'un fullerène nC60. (crédit : Chris Ewels)	20
Figure 2 Illustration de la corrélation entre taille et surface spécifique.	20
Figure 3 Agrandissement d'une assiette antique décorée d'un palmier. Cette décoration utilise la technique du lustre (ici vert et marron).	22
Figure 4 Nombre de produits utilisant des nanotechnologies répertoriés par le PEN (project on emerging nanotechnologies).	24
Figure 5 Nombre de brevets publiés par le bureau américain (USPTO), européen (EPO) et japonais (JPO) de 1976 à 2006. (Chen 2008)	26
Figure 6 Illustration du cycle de vie des nanoparticules et des risques engendrés. (Source : Agence américaine de protection de l'environnement, EPA)	28
Figure 7 Choix du modèle d'étude : cycle de vie de nanoparticules de CeO ₂ et impact environnemental potentiel.	46
Figure 8 Distribution en volume du diamètre hydrodynamique de nanoparticules de CeO ₂ d'une suspension à 10 g/L. Analyse multimodale.	84
Figure 9 Courbe de diffusion des rayons X (SAXS) obtenue pour une suspension de nanoparticules d'oxyde de cérium à 20 g/L.	86
Figure 10 Composition et force ionique du milieu MM.	88
Figure 11 Potentiel d'interaction (U) entre particules sphériques chargées en fonction de la distance de séparation entre particules.	102
Figure 12 - Mesures DLS de l'évolution du diamètre hydrodynamique de nanoparticules de CeO ₂ (5 g/L) en fonction de la concentration en milieu de culture MM.	114
Figure 13 - Histogramme des diamètres hydrodynamiques d'une solution de CeO ₂ (5 g/L) en présence des sels constitutifs du milieu MM (à leur concentration dans le MM).	114
Figure 14 Histogramme représentant l'évolution des diamètres des nanoparticules de CeO ₂ de différentes dilutions dans l'eau en une semaine.	116
Figure 15 Histogramme représentant l'évolution des diamètres des nanoparticules de CeO ₂ de différentes dilutions dans l'acide nitrique (10 ⁻² M) en une semaine.	116
Figure 16 Echelle de potentiel de quelques couples d'éléments.	118
Figure 17 Diagramme potentiel – pH du cérium établi pour trois concentrations de cérium.	120
Figure 18 Diagramme potentiel-pH, de différentes espèces solubles, décrit par Tamilmani et al. 2003 (logiciel STABCAL).	120
Figure 19 Cinétique de dissolution de trois suspensions de nanoparticules de concentrations : 2,5 ; 1,25 et 0,6 g/L de CeO ₂ . Concentration en cérium dissous au cours du temps.	122
Figure 20 Cinétique de dissolution de trois suspensions de nanoparticules de concentrations : 2,5 ; 1,25 et 0,6 g/L de CeO ₂ . Concentration en pourcentage de cérium dissous par rapport au cérium total au cours du temps.	122

Figure 21 Spectres XPS de mica recouvert de NPs de CeO_2 couvrant la zone d'énergie 3d du cérium. Les pics pleins du modèle représentent les pics attribués pour A : au Ce^{III} et B : au Ce^{IV} .	124
Figure 22 - Modélisation schématisée d'une nanoparticule d'oxyde de cérium sur une couche de mica.	126
Figure 23 - Evolution du volume d'une nanoparticule de CeO_2 et du volume de Ce^{III} présent dans la nanoparticule en fonction du temps dans l'eau ultrapure.	128
Figure 24 - Proposition d'un modèle de réduction-dissolution d'une nanoparticule de CeO_2 au cours du temps dans l'eau.	128
Figure 25 Isothermes d'adsorption de <i>Synechocystis</i> et <i>E. coli</i> en contact 30min avec des nanoparticules d'oxyde de cérium dans l'eau ultrapure.	154
Figure 26 Evolutions des mobilités électrophorétiques de <i>Synechocystis</i> et <i>E. coli</i> dans l'eau en fonction de la concentration en CeO_2 .	156
Figure 27 Evolutions de la mobilité électrophorétique de <i>Synechocystis</i> et <i>E. coli</i> dans l'eau en fonction de la concentration en acide nitrique rapportée à son équivalent en concentration de CeO_2 .	158
Figure 28 Analyse XEDS localisée sur un agrégat à proximité d'une bactérie dans l'échantillon : <i>Synechocystis</i> en contact avec des nanoparticules de CeO_2 dans le MM pendant 3h.	166
Figure 29 Représentation schématisée de <i>Synechocystis</i> (vert) entourée de ses EPS recouverts de nanoparticules de CeO_2 (petits ronds jaunes).	182
Figure 30 - Histogramme représentant le volume d'une NP et le volume correspondant de Ce^{III} après des contacts de 3h dans différents milieux avec ou sans cellules.	186
Figure 31 Spectre d'absorbance XANES de NPs CeO_2 ayant subies un contact avec des bactéries au seuil L3 du cérium obtenue à l'ESRF.	186
Figure 32 Spectres XANES de pastilles des échantillons « LB + <i>E. coli</i> -3h » à différentes concentrations en nanoparticules de CeO_2 .	188
Figure 33 Environnement échantillon des mesures XANES réalisées sur la ligne BM30b de l'ESRF.	202
Figure 34 Test de survie (CFU) de <i>Synechocystis</i> en contact pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure.	218
Figure 35 Test LIVE/DEAD réalisé sur une suspension cellulaire de <i>Synechocystis</i> ayant incubé pendant 3h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure.	222
Figure 36 Survie CFU et Live/Dead d'une suspension cellulaire de <i>Synechocystis</i> en contact pendant 3 h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 . Comparaison des résultats obtenus pour des tests LIVE/DEAD (mesures en cuve et mesures en microplaques multipuits) et un test CFU.	224
Figure 37 Survie d'une culture de <i>Synechocystis</i> pendant 3 h dans l'eau ultrapure (test LIVE/DEAD). Comparaison entre l'impact d'une incubation avec des nanoparticules de CeO_2 et d'une incubation avec leur filtrat (sans nanoparticules).	226
Figure 38 Comparaison entre les tests de survie LIVE/DEAD réalisés sur <i>Synechocystis</i> dans l'eau ultrapure (symboles carrés) et l'eau synthétique modérément dure (symboles ronds) en présence pendant 3 h de nanoparticules de CeO_2 (symboles pleins) ou de leur équivalent en concentration d'acide nitrique (symboles vides).	228

Figure 39 Mesures de pH de cultures de <i>Synechocystis</i> mises en contact avec des nanoparticules de CeO_2 (symboles pleins) ou de l'acide nitrique (symboles vides) dans l'eau ultrapure (Carrés) ou dans l'eau synthétique (triangles).	228
Figure 40 Tests de survie (CFU) d' <i>E. coli</i> et <i>Synechocystis</i> en contact pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO_2 dans l'eau ultrapure.	232
Figure 41 Comparaison de la survie d' <i>E. coli</i> (tests CFU dans l'eau ultrapure) après 3 h d'incubation avec des nanoparticules de CeO_2 à une incubation avec le filtrat de ces nanoparticules.	234
Figure 42 Survie d'une culture d' <i>E. coli</i> en contact pendant 3 h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 . Comparaison des résultats obtenus pour un test LIVE/DEAD et un test CFU.	234
Figure 43 Exemples d'attribution de signaux RMN de 4 échantillons (noir : NPs 100 ppm, rouge : NPs 10 ppm, vert : filtrat 100 ppm, violet : filtrat 10 ppm) répétés 4 fois. Déplacements chimiques 4 à 9 ppm.	242
Figure 44 Exemples d'attribution de signaux RMN de 4 échantillons (noir : NPs 100 ppm, rouge : NPs 10 ppm, vert : filtrat 100 ppm, violet : filtrat 10 ppm) répétés 4 fois. Déplacements chimiques de 0 à 4 ppm.	244
Figure 45 Représentation en ACP (normalisation Pareto) des analyses RMN des métabolites d' <i>E. coli</i> en contact 3h dans l'eau avec des nanoparticules (NPs) de CeO_2 ou avec leur filtrat.	248
Figure 46 Liste des régions intégrées avec le nom de la variable correspondante. Traitement par PLS-DA et classification des variables par poids décroissant de leur variance calculée sur les 16 échantillons.	250
Figure 47 Projection en PLS-DA (normalisation Pareto) des variables et attribution de certaines d'entre elles.	250
Figure 48 Schéma générale de la technique de construction des mutants : le clonage par délétion.	254
Figure 49 A gauche, erlenmeyer contenant la souche mutée $\Delta\text{sll5052-10}$ de <i>Synechocystis</i> , à droite erlen contenant la souche sauvage de <i>Synechocystis</i> .	258
Figure 50 Observations au microscope optique de la souche sauvage de <i>Synechocystis</i> (A), et de ses mutants d'EPS : $\Delta\text{sllr1875-2}$ (B) et $\Delta\text{sll5052-10}$ (C).	258
Figure 51 Observations MEB de la souche mutante sll5052-10 .	260
Figure 52 Mesures de mobilités électrophorétiques de différentes cultures de cyanobactéries et bactérie étudiées après trois lavages à l'eau ultrapure.	260
Figure 53 Spectres infrarouges de <i>Synechocystis</i> sauvage avec proposition d'attribution de certaines bandes Hesse et al., 1997.	262
Figure 54 Spectres infrarouges de <i>Synechocystis</i> sauvage et de deux mutants d'EPS de <i>Synechocystis</i> : $\Delta\text{sll5052-10}$ et $\Delta\text{sllr1875-2}$.	262
Figure 55 Observations des phénomènes de floculation-décantation de cultures de mutants EPS de <i>Synechocystis</i> (en haut $\Delta\text{sll5052-10}$, en bas $\Delta\text{sllr1875-2}$) lavées dans l'eau ultrapure puis mises en contact 3h avec des nanoparticules de CeO_2 .	264
Figure 56 Test Live/Dead réalisé sur les mutants $\Delta\text{sllr1875}$ et $\Delta\text{sll5052}$ ainsi que sur la souche sauvage après une mise en contact de 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO_2 .	264
Figure 57 Construction des mutants, étape 1.	278
Figure 58 Construction des mutants, étape 2. Construction de la cassette de délétion.	280
Figure 59 Construction des mutants, étape 3. Transformation dans <i>Synechocystis</i> .	284
Figure 60 Construction des mutants, étape 4. Vérification de la construction par séquençage.	284

Figure 61 Images MET (gauche) et haute résolution (droite) de nano-tiges d'oxydes de cérium obtenues par la méthode de Mai 2005.	309
Figure 62 Comparaison de l'évolution du diamètre des nanoparticules de CeO_2 (12 g/L) pour deux concentrations en sel (0,6 M et 0,8 M de NaCl) en fonction du temps.	310
Figure 63 Quantification du cérium par électrophorèse capillaire Beckman. Exemple de spectres obtenus et de courbe de calibration.	313
Figure 64 Isotherme d'adsorption de nanoparticules de CeO_2 sur du latex (50m ² /l).	313
Figure 65 Etat d'agrégation d'une culture de <i>Synechocystis</i> dans l'eau en présence de différentes concentrations en CeO_2 NPs après 1h, suivi par LALS (diffusion de lumière aux petits angles).	314
Figure 66 Pourcentage de colonies formées par rapport au témoin (sans NPs) d'une suspension de <i>Synechocystis</i> en contact avec différentes concentrations de : A : TiO_2 NPs et B : Fe_2O_3 NPs dans l'eau ultrapure pendant 3h.	316
Figure 67 Tests de respiration d'une suspension de <i>Synechocystis</i> mise en contact avec des CeO_2 NPs pendant 5 min dans l'eau.	318
Figure 68 Tests de respiration d'une suspension de <i>Synechocystis</i> mise en contact avec des CeO_2 NPs pendant 2h dans l'eau.	318
Figure 69 Diagramme énergétique de la photoémission (source : biophyresearch, analyse ESCA).	324
Figure 70 – Diffusion multiple d'un photoélectron par les atomes des premières sphères de coordination.	324
Figure 71 – Représentation de l'évolution du potentiel électrique d'une particule chargée en fonction de la distance à la surface.	325
Figure 72 Formule semi-développée du bleu alcian.	326
Figure 73 Diagramme de phase typique présentant les trois phases (solide, liquide, vapeur) d'un composé ainsi que le point triple (T : coexistence des trois phases) et le point supercritique (C : au-delà duquel le fluide possède les caractéristiques du liquide et du gaz).	326
Figure 74 Illustration simplifiée du principe du test de survie en gouttes.	327
Figure 75 Illustration simplifiée du principe du test CFU.	328

Table des matières des photographies

<i>Photo 1 – Quelques exemples de la diversité morphologique présente chez les cyanobactéries. [Crédit : http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html]</i>	72
<i>Photo 2 – Quelques exemples de la présence de cyanobactéries dans l'environnement. [Crédit : http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html]</i>	72
<i>Photo 3 - Photographie en microscopie optique d'une culture de Synechocystis PCC 6803 en phase exponentielle. Présence de cellules en division (doublets) et de cellules individuelles (singulets).</i>	74
<i>Photo 4 - Photographie MET, d'une coupe de bactérie Synechocystis PCC 6803 obtenue au laboratoire et interprétée d'après les travaux de Van de Meene et al., 2005.</i>	74
<i>Photo 5 Bactéries E. coli observées en MEB. [Crédit : Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH]</i>	76
<i>Photo 6 Image AFM de NPs de CeO₂ déposées sur lame de mica. Les images ont été obtenues en mode tapping.</i>	84
<i>Photo 7 - De 1 à 3 : ajout progressif de nanoparticules de CeO₂ (10 g/L) à une solution de MM (100 %), il y a formation d'un précipité blanc. 4 : agrandissement du précipité blanc obtenu.</i>	114
<i>Photo 8 Floculation d'une culture de Synechocystis en contact 2h avec des CeO₂ NPs dans le milieu de culture MM.</i>	146
<i>Photo 9 Floculation d'une culture de Synechocystis en contact 2h avec des CeO₂ NPs dans l'eau ultrapure.</i>	146
<i>Photo 10 Floculation d'une culture de Synechocystis en contact 2h avec du Ce(NO₃)₃ dans l'eau ultrapure.</i>	146
<i>Photo 11 Floculation d'une culture de E. coli en contact 2h avec des CeO₂ NPs dans l'eau ultrapure.</i>	146
<i>Photo 12 Floculation d'une culture de E. coli en contact 2h avec du Ce(NO₃)₃ dans l'eau ultrapure.</i>	146
<i>Photo 13 Différentes vues d'un échantillon de Synechocystis observé en MET après 3h dans l'eau ultrapure.</i>	160
<i>Photo 14 Différents échantillons observés en MET avec des colorations différentes de Synechocystis en contact avec 240 ppm de CeO₂ nanoparticulaires pendant 3h dans l'eau ultrapure.</i>	160
<i>Photo 15 Différentes vues observées en MET d'un échantillon de Synechocystis en contact avec 240 ppm de CeO₂ nanoparticulaires pendant 3h dans le MM.</i>	162
<i>Photo 16 Différentes vues d'un échantillon observé en MET de E. coli ayant incubées 3h dans l'eau ultrapure avec 240 ppm de CeO₂ nanoparticulaires.</i>	162
<i>Photo 17 Observations HAADF et cartographie EDS de Synechocystis en contact 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO₂.</i>	164
<i>Photo 18 Observations HAADF et cartographie EDS d'un agrégat présent dans l'échantillon Synechocystis en contact 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO₂.</i>	164
<i>Photo 19 Observations HAADF et EDS de Synechocystis en contact 3h dans le MM avec des nanoparticules de CeO₂.</i>	166
<i>Photo 20 Observations HAADF et EDS de E. coli en contact 3h dans l'eau avec des NPs de CeO₂.</i>	168
<i>Photo 21 Détails de l'échantillon : E. coli en contact avec des NPs de CeO₂ pendant 3h dans l'eau.</i>	168
<i>Photo 22 Mise en évidence en microscopie optique de la présence ou non d'EPS dans des cultures de cellules lavée dans l'eau ultrapure grâce à l'encre de Chine.</i>	172

<i>Photo 23 Images de Synechocystis observées en MEB après fixation (glutaraldéhyde et bleu alcian), déshydratation dans l'éthanol et séchage au CO₂ supercritique.</i>	174
<i>Photo 24 Images de Synechocystis observées en MEB après fixation (glutaraldéhyde et bleu alcian), suivie par un séchage direct au CO₂ supercritique.</i>	176
<i>Photo 25 Observation MET d'un groupe de bactéries Synechocystis en contact avec des nanoparticules de CeO₂ pendant 3h dans l'eau.</i>	176
<i>Photo 26 Observations HAADF et EDS de Synechocystis en contact 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO₂.</i>	178
<i>Photo 27 Observations MET d'une cellule de Synechocystis en contact pendant 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO₂.</i>	178
<i>Photo 28 Observations MET de bactéries E. coli en contact pendant 3h dans l'eau ultrapure avec des nanoparticules de CeO₂.</i>	180
<i>Photo 29 Test en gouttes réalisé sur Synechocystis en contact pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO₂ dans le milieu de culture MM.</i>	214
<i>Photo 30 Test en gouttes réalisé sur des cellules de Synechocystis incubées pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO₂ dans l'eau ultrapure avant dépôt sur milieu solide. Première goutte non diluée puis dilution par 10 et dilutions suivantes de 4 en 4.</i>	216
<i>Photo 31 Test en gouttes réalisé sur des cellules de Synechocystis incubées pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO₂-PAA dans l'eau ultrapure avant dépôt sur milieu solide. Première goutte non diluée puis dilutions successives de 10 en 10.</i>	216
<i>Photo 32 Test en gouttes réalisé sur E. coli en contact pendant 3 h avec des nanoparticules de CeO₂ dans l'eau ultrapure. Dilutions réalisées de 4 en 4.</i>	232
<i>Photo 33 - Nanoparticules d'oxyde de titane (rutile) en contact avec Synechocystis pendant moins d'une heure dans l'eau ultrapure.</i>	315
<i>Photo 34 - Nanoparticules d'oxyde de fer (Maghémite, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) en contact avec Synechocystis pendant moins d'une heure dans l'eau ultrapure.</i>	315
<i>Photo 35 – Observations MET de cellules de Synechocystis ayant incubé pendant 3h avec des NPs de TiO₂ (photos A et B) et des NPs de Fe₂O₃ (photos C et D) dans l'eau ultrapure.</i>	316
<i>Photo 36 – Suspensions cellulaires de Synechocystis ayant incubées pendant plus d'une heure dans l'eau ultrapure avec A : 83 ppm de NPs CeO₂-PAA et B : la quantité équivalente de PAA (1%).</i>	317

Table des matières des tableaux

<i>Tableau 1 Exemples de produits utilisant des nanotechnologies et des nanomatériaux. (Source : Woodrow Wilson Consumer Products Inventory)</i>	26
<i>Tableau 2 Exemples de prédiction des concentrations environnementales en nanoparticules d'argent, d'oxyde de titane et de fullerènes dans l'air, l'eau et le sol.</i>	36
<i>Tableau 3 - Tableau résumant les conditions des échantillons analysés pour la cinétique de dissolution.</i>	126
<i>Tableau 4 - Résultat de la modélisation de la réduction-dissolution d'une nanoparticule d'oxyde de cérium.</i>	126
<i>Tableau 5 - Tableau résumant les conditions de préparation des échantillons analysés en XPS et les intégrations des pics correspondant au cérium.</i>	184
<i>Tableau 6 - Tableau résumant la réduction-dissolution d'une nanoparticule dans différentes conditions de contact (modèles biologiques et/ou milieux) et suivant le modèle présenté en II.</i>	184
<i>Tableau 7 - Résumé des quantifications Ce^{III}/Ce obtenues en XANES pour différentes conditions de contact.</i>	188

Annexes - Résultats

Préparation de nano-tiges de CeO₂

Des nanoparticules de CeO₂ de différentes formes et tailles (cubes, tiges, et sphères) ont été synthétisées en utilisant la méthode décrite par *Mai et al., J.Phys.ChemB, 2005*. La description ci-après montre un exemple des nano-tiges de CeO₂ obtenues par cette méthode.

Matériels et méthodes :

Dans un flacon en téflon, 70 mL d'une solution de soude à 6 M sont ajoutés, goutte à goutte sous agitation magnétique, à 10 g d'une solution de nitrate de cérium à 173 g/kg. Le mélange est laissé sous agitation magnétique pendant 30 min. Le flacon est ensuite scellé et placé pendant 24 h dans une étuve à 100 °C.

Résultats :

L'image MET, ci-après, présente les nanoparticules obtenues. Ces dernières ont une structure en forme de tiges. Les mesures de diffusion de lumière montrent qu'il s'agit d'une suspension stable de nanoparticules de diamètre hydrodynamique moyen de 200 nm.

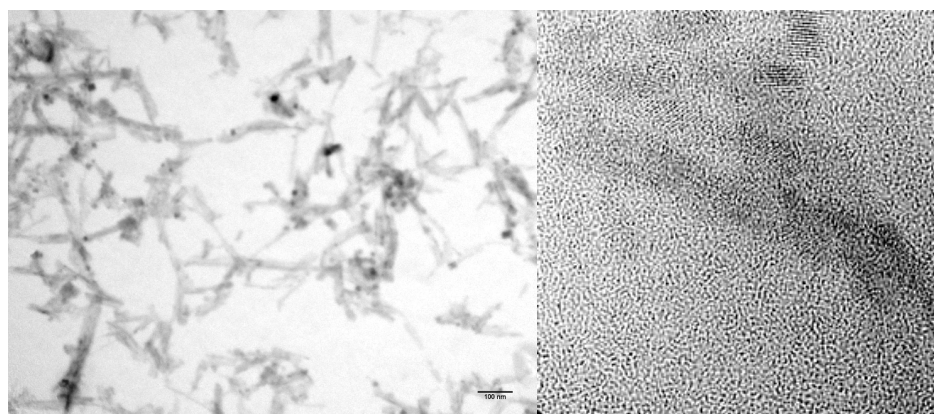


Figure 61 Images MET (gauche) et haute résolution (droite) de nano-tiges d'oxydes de cérium obtenues par la méthode de Mai 2005.

Cinétique d'agrégation des NPs en présence de sel

Les résultats ci-après présentent un exemple de mesures cinétiques de l'agrégation des nanoparticules en présence de NaCl.

Matériels et méthodes :

Les nanoparticules de CeO₂ et les sels de NaCl ont été mélangés sous forme de poudre, puis l'eau a été ajoutée afin d'obtenir les concentrations finales souhaitées : 12 g/L (CeO₂) et 0,6 et 0,8 M de NaCl. La taille des particules a été enregistrée en mesure de diffusion de lumière au cours du temps sur un zétasizer Nano SZ.

Résultats :

Le graphique ci-après confirme que la vitesse d'agrégation des nanoparticules augmente avec la concentration en sel du milieu de dispersion. En effet, à 0,8 M la taille des NPs passe de 7

nm à 80 nm en 2h tandis qu'à 0,6 M plus de 4h sont nécessaires pour obtenir la même taille d'agrégats. Plus le temps d'incubation des expériences est long, plus la force ionique du milieu test doit donc être faible afin d'éviter les phénomènes d'agrégation nanoparticulaire.

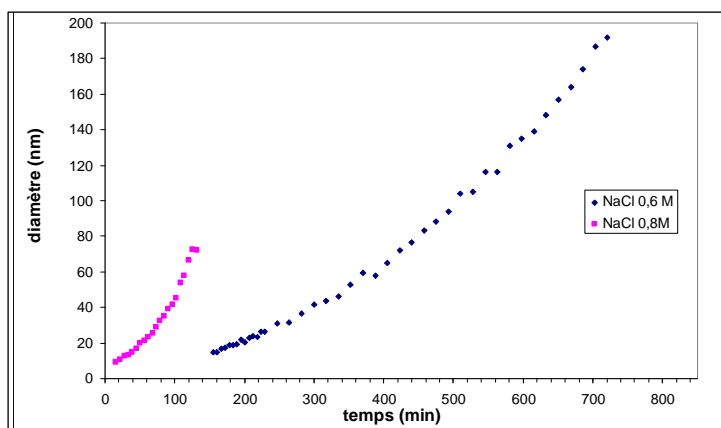
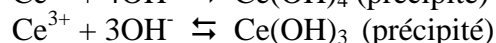
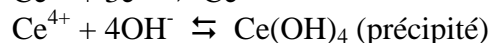
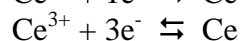
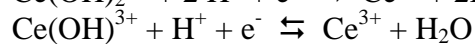
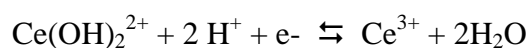


Figure 62 Comparaison de l'évolution du diamètre des nanoparticules de CeO₂ (12 g/L) pour deux concentrations en sel (0,6 M et 0,8 M de NaCl) en fonction du temps.

Construction du diagramme de Pourbaix

Le diagramme de Pourbaix théorique (ou diagramme potentiel-pH) des oxydes de cérium permet de comprendre les phénomènes redox mis en jeu dans les suspensions de nanoparticules. La partie ci-après décrit comment il a été établi.

• Equations mises en jeu :



E°/V :

1,73

1,715

1,72

-2,336

Ks = 10⁻⁵¹

Ks = 10⁻²¹

Ke = 10⁻¹⁴

• Etude des équilibres de précipitation :



$$K_s = 10^{-21} = [\text{Ce}^{3+}] [\text{OH}^-]^3 = [\text{Ce}^{3+}] \frac{K_e^3}{[\text{H}^+]^3} \Rightarrow [\text{Ce}^{3+}] = \frac{K_s}{K_e^3} [\text{H}^+]^3$$

d'où : $\log[\text{Ce}^{3+}] = -3\text{pH} + 21$, donc :

$$\boxed{\text{pH}_1 = \frac{21}{3} - \frac{1}{3} \log[\text{Ce}^{3+}]}$$



De même que pour l'équilibre précédent on obtient :

$$pH_2 = 1,25 - \frac{1}{4} \log [Ce^{4+}]$$

• Etudes des potentiels



$$E_1 = E_{Ce^{4+}/Ce^{3+}}^0 = 1,72$$



$$E_2 = E_{Ce^{3+}/Ce}^0 + \frac{0,059}{3} \log [Ce^{3+}]$$

D'où :

$$E_2 = -2,336 + \frac{0,059}{3} \log [Ce^{3+}]$$



$$E_3 = E_{Ce(OH)_3/Ce}^0 + \frac{0,059}{3} \log \frac{[Ce(OH)_3][H^+]^3}{[Ce_s]} = E_{Ce(OH)_3/Ce}^0 - 0,059 pH$$

Au point de coexistence des trois espèces : $E_3 = E_2$

$$E_{Ce(OH)_3/Ce}^0 - 0,059 pH = E_{Ce^{3+}/Ce}^0 + \frac{0,052}{3} \log [Ce^{3+}]$$

$$\text{Or : } [Ce^{3+}] = \frac{K_S}{Ke^3} [H^+]^3$$

$$\text{d'où : } E_{Ce(OH)_3/Ce}^0 - 0,059 pH = E_{Ce^{3+}/Ce}^0 + \frac{0,052}{3} \log \frac{K_S}{Ke^3} [H^+]^3$$

$$\text{et : } E_{Ce(OH)_3/Ce}^0 = -1,92$$

Ainsi :

$$E_3 = -1,92 - 0,059 pH$$



$$E_4 = E_{Ce(OH)_4/Ce^{3+}}^0 + \frac{0,059}{3} \log \frac{[Ce(OH)_4][H^+]^4}{[Ce^{3+}]}$$

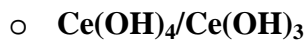
Au point de coexistence des trois espèces : $E_4 = E_2$

$$E_{Ce(OH)_4 / Ce^{3+}}^0 - 0,236 pH = E_{Ce^{4+} / Ce^{3+}}^0 + 0,059 \log [Ce^{4+}]$$

$$\text{or : } [Ce^{4+}] = \frac{K_S}{K_e^4} [H^+]^4$$

$$\text{donc : } E_{Ce(OH)_4 / Ce^{3+}}^0 = 2,015$$

$$\text{D'où : } \boxed{E_4 = 2,015 - 0,236 pH - 0,059 \log [Ce^{3+}]}$$



$$E_5 = E_{Ce(OH)_4 / Ce(OH)_3}^0 - 0,059 pH$$

Au point de coexistence des trois espèces : $E_5 = E_4$

$$E_{Ce(OH)_4 / Ce(OH)_3}^0 - 0,059 pH = E_{Ce(OH)_4 / Ce^{3+}}^0 - 0,236 pH - 0,059 \log [Ce^{3+}]$$

$$\text{Or : } [Ce^{3+}] = \frac{K_S}{K_e^3} [H^+]^3$$

$$\text{D'où : } E_{Ce(OH)_4 / Ce(OH)_3}^0 = 0,776$$

$$\text{En conclusion : } \boxed{E_5 = 0,776 - 0,059 pH}$$

• **Calculs des équations pour différentes concentrations en Ce^{3+} :**

Les équations $E = f(pH)$ ont été établies pour trois concentrations différentes en Ce^{3+} : $C_1 = 5,18 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; $C_2 = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ et $C_3 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

○ H_2O/H_2 : $\boxed{E_a = -0,059 pH}$

○ O_2/H_2O : $\boxed{E_b = 1,229 - 0,059 pH}$

Construction de l'isotherme d'adsorption

Dans cette annexe, nous proposons une méthode de validation de l'établissement de l'isotherme d'adsorption des nanoparticules de CeO_2 sur les bactéries en utilisant les billes de latex comme modèles.

Matériels et méthodes :

Les échantillons sont préparés de manière identique à celle décrite dans la partie matériels et méthode sauf que les suspensions cellulaires sont remplacées par des suspensions de latex à 1,33 g/L, de densité 1,6 et de diamètre 100 nm.

Résultats :

La figure ci-après montre un exemple de spectres obtenus en électrophorèse capillaire après réduction des échantillons de nanoparticules. Les ions Fe^{2+} proviennent de la réduction du Ce^{IV} en Ce^{III} avec le sel de Mohr.

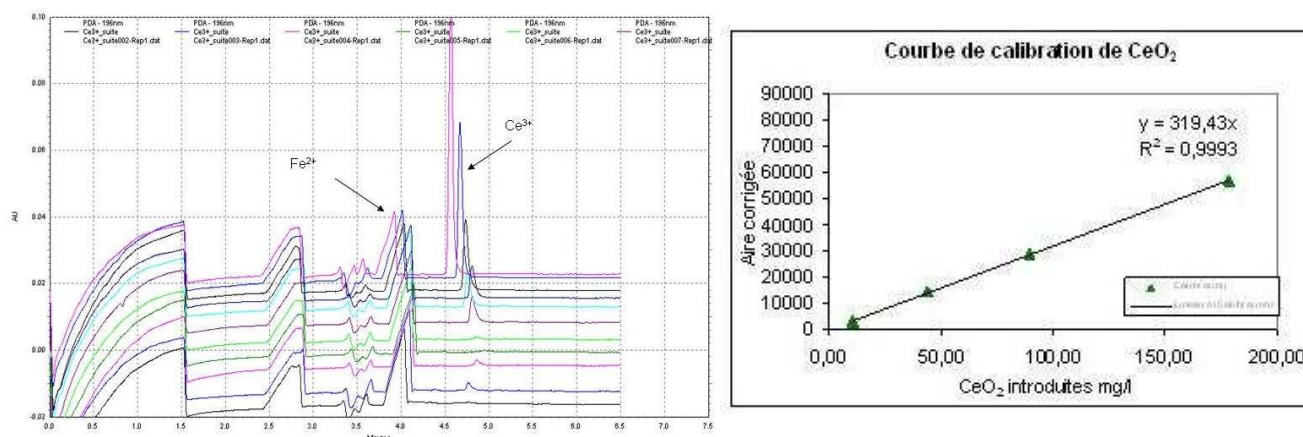
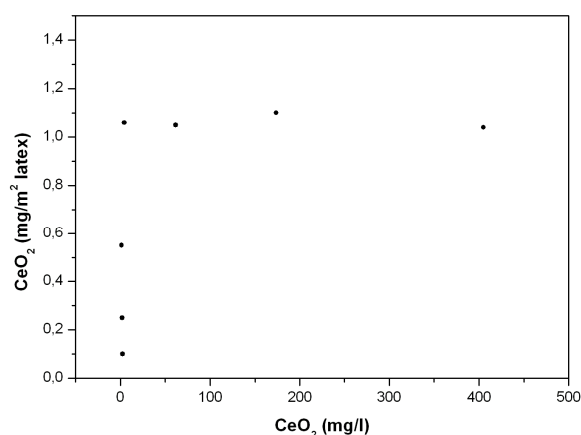


Figure 63 Quantification du cérium par électrophorèse capillaire Beckman. Exemple de spectres obtenus et de courbe de calibration.



Le calcul de la quantité d'oxydes de cérium adsorbés sur le latex présente un maximum d'adsorption pour 1mg de cérium par m^2 de latex, ce qui est conforme à ce qui était attendu théoriquement pour l'adsorption de nanoparticules de masse spécifique 1 mg/m^2 et une suspension de latex développant une surface de 50 m^2/L . L'électrophorèse est donc bien une méthode adaptée aux mesures de la concentration des ions Ce^{3+} .

Figure 64 Isotherme d'adsorption de nanoparticules de CeO_2 sur du latex (50 m^2/l).

Analyse de la floculation des bactéries par LALS

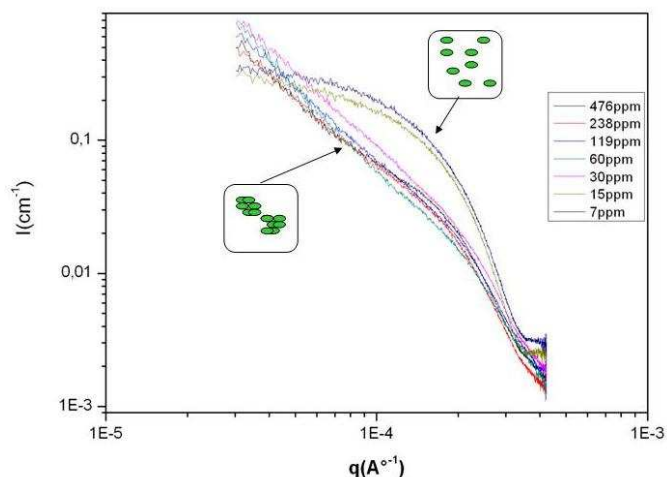
Afin de qualifier la floculation des cellules en présence de nanoparticules de CeO_2 , les suspensions cellulaires ont été analysées en diffusion de lumière aux petits angles (LALS). Cette technique permet de mesurer des colloïdes de tailles supérieures à $1\ \mu\text{m}$ et est donc adaptée à la mesure de flocs de cellules.

Matériels et méthodes :

Les échantillons analysés sont obtenus de la même manière que pour les tests de survie : 3 lavages dans l'eau ultrapure d'une suspension cellulaire de *Synechocystis* aliquotée en fraction de 2 mL puis ajout de 100 μL de solutions de CeO_2 NPs sous agitation (vortex). Les mesures sont effectuées environ 1h après l'ajout des nanoparticules.

Résultats :

Les analyses LALS ci-dessous montrent que, pour les concentrations inférieures à 15 ppm de CeO_2 , le signal mesuré est celui de



sphères d'environ $2\ \mu\text{m}$ de diamètre, ce qui correspond aux bactéries individualisées. En revanche, pour les concentrations supérieures ou égales à 30 ppm, le signal est celui d'agrégats mal structurés puisque l'on n'observe pas de pic de corrélation entre les bactéries. Cette expérience confirme que les suspensions cellulaires contenant plus de 30 ppm de CeO_2 floculent à petites échelles malgré leur aspect stable à l'échelle macroscopique.

Figure 65 Etat d'agrégation d'une culture de *Synechocystis* dans l'eau en présence de différentes concentrations en CeO_2 NPs après 1h, suivi par LALS (diffusion de lumière aux petits angles).

Interactions avec les NPs de rutile et maghémite

La majorité de cette étude a été consacrée à l'étude des nanoparticules de CeO_2 . Cependant des nanoparticules de rutile (TiO_2) et maghémite (Fe_2O_3) ont également été étudiées mais de façon moins détaillée, nous présentons ici les expériences de floculation, survie et microscopie électronique réalisées sur *Synechocystis* en présence de ces nanoparticules.

Matériels et méthode :

Les cultures de *Synechocystis* ($\text{DO}=0,5$) sont lavées 3 fois dans l'eau ultrapure puis aliquotées en fraction de 2 mL. Des suspensions de rutile (nanotubes de longueur moyenne 180 nm) et de maghémite (nanoparticules de diamètre moyen 26 nm) sont ajoutées (100 μL dans 2 mL) aux

suspensions cellulaires sous agitation. Les concentrations finales en solution sont comprises entre 2,75 et 176 ppm de TiO_2 et 4,6 et 294 ppm de Fe_2O_3 .

Les photographies des suspensions sont effectuées après 1h d'incubation et les tests de survie ainsi que les images de microscopie électronique sont effectués après 3h d'incubation, de la manière décrite en matériels et méthodes pour CeO_2 .

Résultats :

• Flocculation

Les suspensions de *Synechocystis* dans l'eau ultrapure flocculent en présence de nanoparticules de rutile et maghémite à partir de, respectivement, 44 ppm et 73 ppm (voir photographies ci-dessous). Cependant, contrairement aux NPs de CeO_2 , on n'observe aucune stabilisation des agrégats cellulaires pour les concentrations plus importantes en NPs. Soit ces concentrations ne sont pas atteintes dans l'intervalle testé, soit la flocculation est provoquée par les cations métalliques présents dans les suspensions de nanoparticules. En effet, leur présence est soupçonnée à cause des colorations bleutée et orangée observées dans les suspensions cellulaires en présence de fortes concentrations de NPs respectivement de rutile et de maghémite.

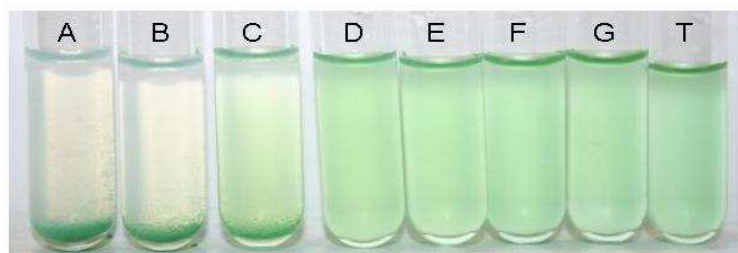


Photo 33 - Nanoparticules d'oxyde de titane (rutile) en contact avec *Synechocystis* pendant moins d'une heure dans l'eau ultrapure.

Concentrations en TiO_2 : A : 176 ppm ; B : 88 ppm ; C : 44 ppm ; D : 22 ppm ; E : 11 ppm ; F : 5,5 ppm ; G : 2,75 ppm ; T : 0 ppm.

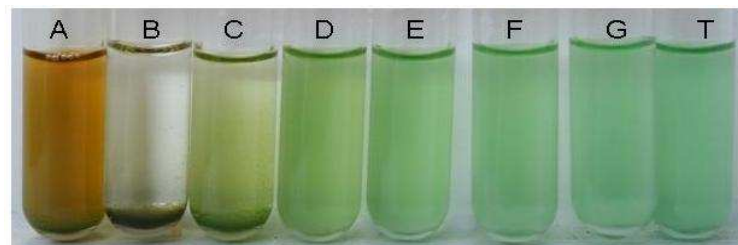


Photo 34 - Nanoparticules d'oxyde de fer (Maghémite, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) en contact avec *Synechocystis* pendant moins d'une heure dans l'eau ultrapure.

Concentrations en Fe_2O_3 : A : 294 ppm ; B : 147 ppm ; C : 73,6 ppm ; D : 36,8 ppm ; E : 18,4 ppm ; F : 9,2 ppm ; G : 4,6 ppm ; T : 0 ppm.

• Survie

Le test de survie en présence d'oxyde de titane (graphique A) montre une survie similaire à celle observée avec les nanoparticules d'oxyde de cérium dans l'eau (plateau à environ 20% de survie pour les fortes concentrations en nanoparticules). En revanche, la survie en présence d'oxyde de fer (graphique B) est plus élevée que pour les deux autres types de nanoparticules (environ 50% de survie pour les fortes concentrations en nanoparticules). Ces mortalités peuvent être provoquées par les nanoparticules elles-mêmes ou bien par leur environnement (ions métalliques dissous, acide...).

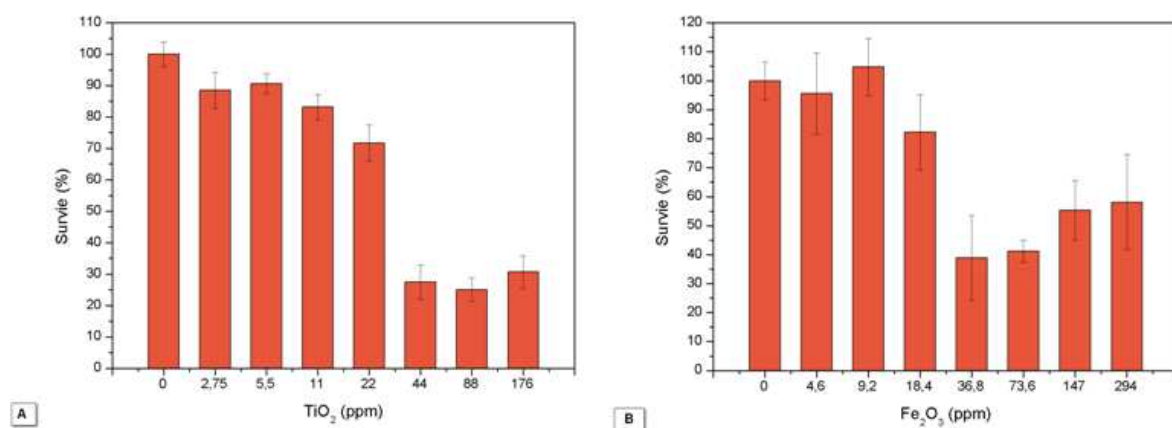
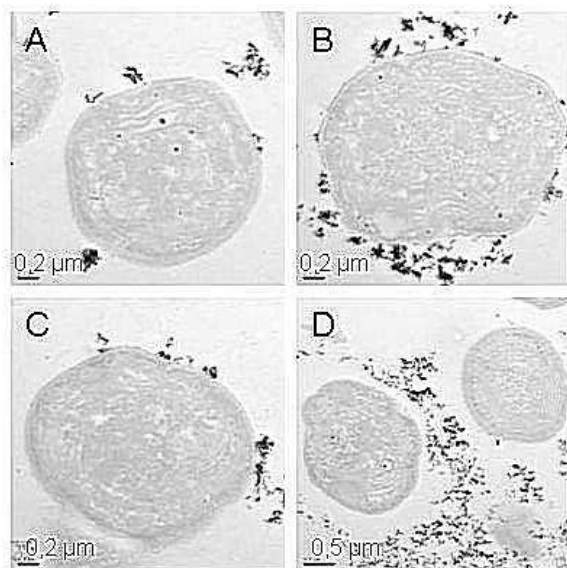


Figure 66 Pourcentage de colonies formées par rapport au témoin (sans NPs) d'une suspension de *Synechocystis* en contact avec différentes concentrations de : A : TiO_2 NPs et B : Fe_2O_3 NPs dans l'eau ultrapure pendant 3h.

Dans le milieu de culture MM, de la même manière que pour les nanoparticules de cérium, il n'y a aucun effet flagrant des nanoparticules de titane et de maghémite sur la survie de *Synechocystis*.

- **Observations en microscopie électronique (MET)**



Quelques nanotubes de titane (photos A et B) et nanoparticules de maghémite (photos C et D) sont observés en contact direct ou proche de la paroi cellulaire de *Synechocystis* dans l'eau ultrapure. Les photos B et D laissent suggérer la présence d'exopolysaccharides (EPS) sur lesquels les nanoparticules viennent s'adsorber. Comme dans le cas des nanoparticules d'oxyde de cérium, les EPS jouent probablement un rôle de barrière protectrice entre la paroi cellulaire et les nanoparticules de rutile et de maghémite.

Photo 35 – Observations MET de cellules de *Synechocystis* ayant incubé pendant 3h avec des NPs de TiO_2 (photos A et B) et des NPs de Fe_2O_3 (photos C et D) dans l'eau ultrapure.

Cependant, des analyses HAADF et EDS sur ces échantillons ont révélé la présence de titane à l'intérieur des cellules. Cet élément semblant être présent de manière diffuse dans les cellules, il est possible que le titane mesuré soit du titane présent initialement sous forme ionique dans la suspension de NPs.

Interaction en présence de CeO₂-PAA

En présence de nanoparticules de CeO₂ recouvertes de PAA (acide polyacrylique), on n'observe aucune floculation bactérienne ni impact sur la survie de *Synechocystis*. Des observations des suspensions de *Synechocystis* en microscopie optique et en présence d'encre de Chine ont permis de mettre en évidence les interactions particulières dues à la charge négative des nanoparticules.

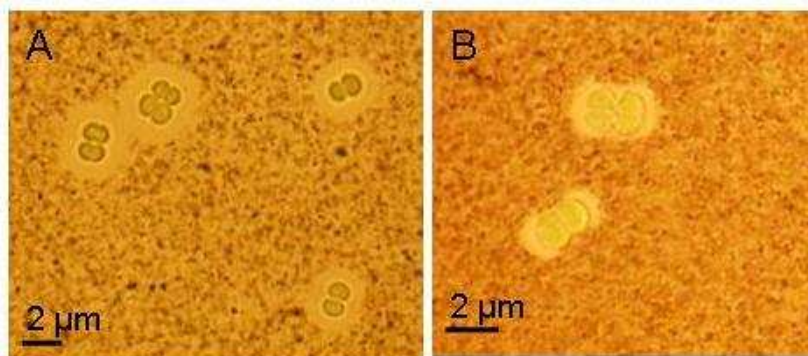


Photo 36 – Suspensions cellulaires de *Synechocystis* ayant incubées pendant plus d'une heure dans l'eau ultrapure avec A : 83 ppm de NPs CeO₂-PAA et B : la quantité équivalente de PAA (1%). Les EPS sont mis en évidence par la présence d'encre de Chine.

En présence de CeO₂-PAA, l'épaisseur de la couche d'EPS est plus importante (voir photo ci-dessus) tandis qu'elle semble restreinte dans le cas d'une incubation en présence de PAA. Les NPs s'adsorbent peut-être (par les atomes de surface chargés positivement et non recouverts de PAA) sur les EPS, et les charges négatives des PAA contribuent alors à la répulsion électrostatique des colloïdes de l'encre de Chine.

Influence des NPs sur la respiration de *Synechocystis*

Nous avons vérifié l'impact des NPs de CeO₂ sur la respiration et la photosynthèse de *Synechocystis*.

Matériels et méthode :

Les cultures de *Synechocystis* (DO=0,5) sont lavées 3 fois et resuspendues dans de l'eau ultrapure. La suspension cellulaire (1 mL) est introduite dans la cuve de mesure de l'oxymètre puis 50 μL d'une suspension de nanoparticules de CeO₂. Le témoin a reçu un volume d'eau ultrapure égal au volume de solution de nanoparticules ajouté dans les autres cas. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique et sous un flux lumineux (3000 lux) pendant 5 min ou 2 h (suivant l'expérience). Puis 1 mL de milieu MM est ajouté (afin de limiter la pression osmotique) et la suspension est, à partir de ce moment, maintenue dans l'obscurité. La concentration en oxygène dissous en solution est mesurée à l'aide d'une sonde Hansatech (HANW22).

Résultats :

- 5 min de contact dans l'eau

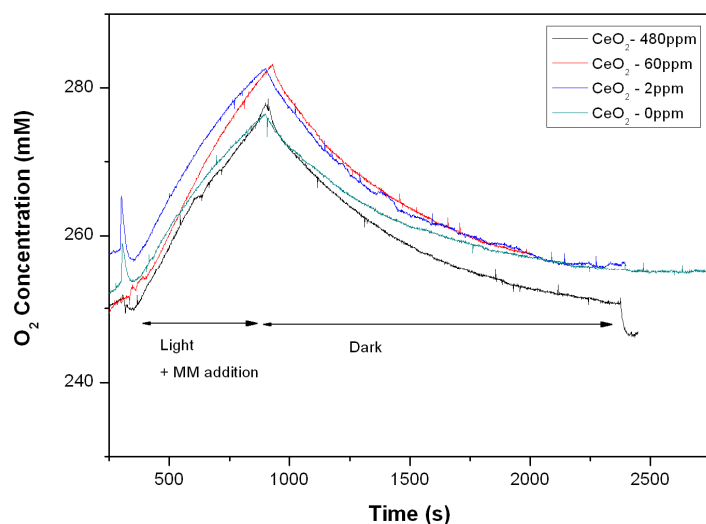


Figure 67 Tests de respiration d'une suspension de *Synechocystis* mise en contact avec des CeO₂ NPs pendant 5 min dans l'eau.

La photosynthèse et la respiration sont mesurées respectivement en présence et en absence de lumière.

On ne constate aucun effet important des nanoparticules sur la respiration et la photosynthèse de *Synechocystis* (voir graphique ci-dessus). La culture contenant 480 ppm de nanoparticules semble consommer plus d'oxygène mais cet effet est probablement dû à l'effet « stockeur d'oxygène » des nanoparticules d'oxyde de cérium.

Nous en avons déduit que les 5 min de contact entre nanoparticules et bactéries, avant l'ajout du milieu de culture, n'étaient probablement pas suffisantes.

- 2h de contact dans l'eau

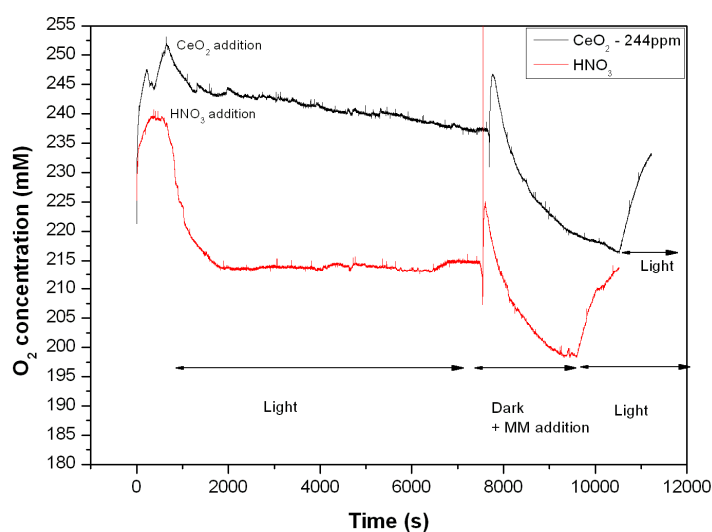


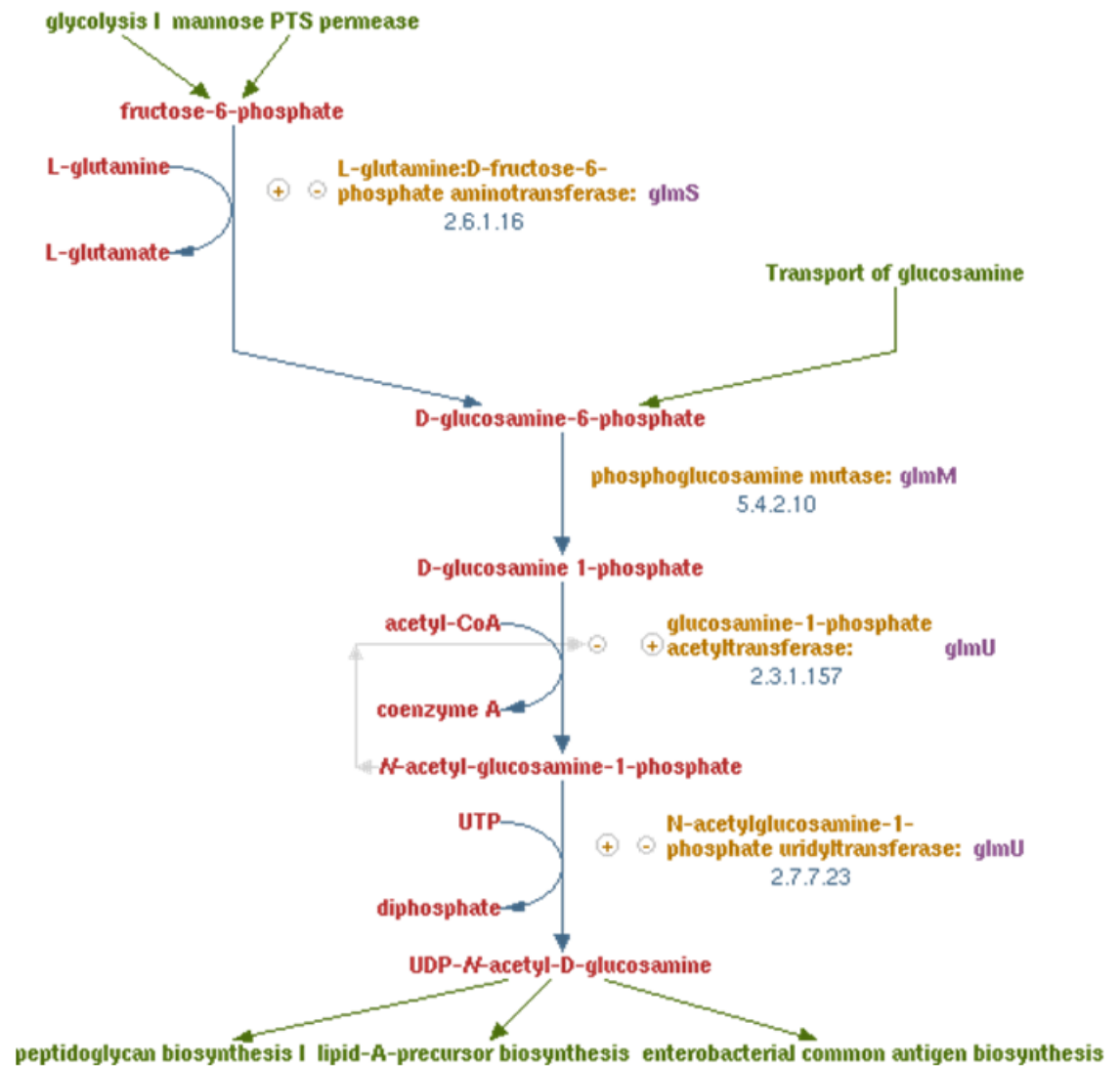
Figure 68 Tests de respiration d'une suspension de *Synechocystis* mise en contact avec des CeO₂ NPs pendant 2h dans l'eau.

La photosynthèse et la respiration sont mesurées respectivement en présence et en absence de lumière. Le témoin a reçu l'ajout d'un volume d'acide nitrique (10^{-2} M) égal au volume de solution de nanoparticules ajouté.

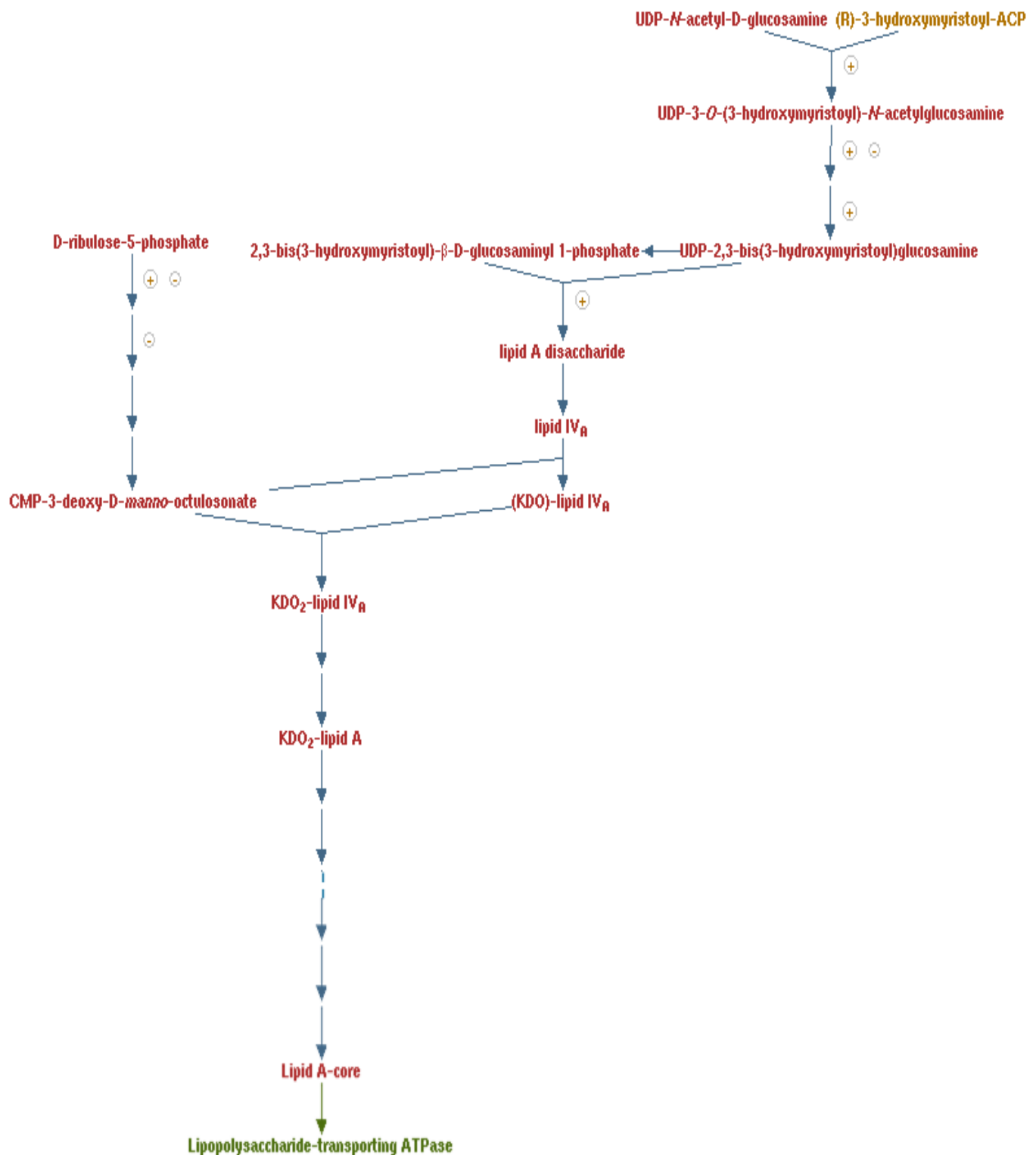
Après 2h d'incubation dans l'eau ultrapure, il n'y a aucune différence entre la respiration et la photosynthèse de l'échantillon avec nanoparticules et le témoin sans nanoparticules mais en présence d'acide nitrique.

Deux exemples de voies métaboliques chez *E. coli*

1. Biosynthèse de l'UDP-N-acetyl-D-glucosamine



2. Biosynthèse des lipopolysaccharides



Les représentations schématiques des voies métaboliques présentées ci-dessus proviennent du site : <http://biocyc.org/server.html>.

<h2>Annexes - Méthodes</h2>

Spectrométrie de masse quadripolaire à source plasma (ICP-MS)

Le principe de l'ICP-MS, initiales pour « Inductively coupled plasma mass spectrometer », réside dans la séparation, l'identification et la quantification d'éléments en fonction de leur charge et de leur masse.

Cette technique d'analyse est notamment très prisée pour l'analyse de traces et ultratracés dans les roches, l'eau, les sols et les systèmes biologiques.

L'ICP-MS peut être divisée en quatre étapes : l'introduction-nébulisation, l'ionisation, la séparation en masse, et la détection.

L'échantillon sous forme liquide est introduit dans la chambre de vaporisation, où un nébuliseur à argon le transforme en aérosol liquide composé de gouttes fines de quelques microns. Cet aérosol est ensuite envoyé dans une torche à plasma à argon à très hautes températures (6 000 à 10 000 °C), qui le transforme en plasma. Après cette étape la plupart des composants ont été dissociés, vaporisés, atomisés et ionisés.

L'échantillon est introduit dans une chambre où un vide différentiel dévie les ions chargés positivement vers un système de lentilles électrostatiques. Les ions sont ensuite transportés vers un filtre de masse-quadripolaire. Ce filtre sépare les ions ayant un rapport masse sur charge particulier. La sélection s'effectue en fonction de la fréquence appliquée sur le filtre. Un détecteur d'ions détecte le nombre d'électrons produits lorsqu'un ion dévié par le filtre heurte les dynodes du détecteur. Grâce à un système d'étalons internes et externes (solutions étalons), le nombre de coups enregistrés permet de calculer, pour un isotope donné, la concentration de l'élément analysé.

Cette technique permet d'analyser entre 20 et 30 éléments en quelques minutes. Elle permet de mesurer des traces de l'ordre du ppb (10^{-9} g/g) avec une incertitude sur la mesure, en analyse de routine, inférieure à 3 %.

Les limites de l'ICP-MS sont la détection d'éléments de rapport masse sur charge très proches, d'éléments très légers, ou ne pouvant pas être ionisés positivement.

Spectroscopie de photoélectron XPS

La spectroscopie de photoélectron (XPS : X-Ray Photoelectron Spectroscopy) est basée sur l'analyse de l'énergie cinétique de photoélectrons émis par les atomes d'un solide lors d'une irradiation par des photons X. Tout électron des couches de cœur ou de valence, dont l'énergie de liaison est inférieure à l'énergie des photons X incidents ($h\nu$), peut être extrait. Le spectre des énergies de liaison des électrons de cœur est spécifique d'un atome, ce qui permet son identification et son dosage. L'analyse XPS est une analyse élémentaire de surface, non ou très faiblement destructive.

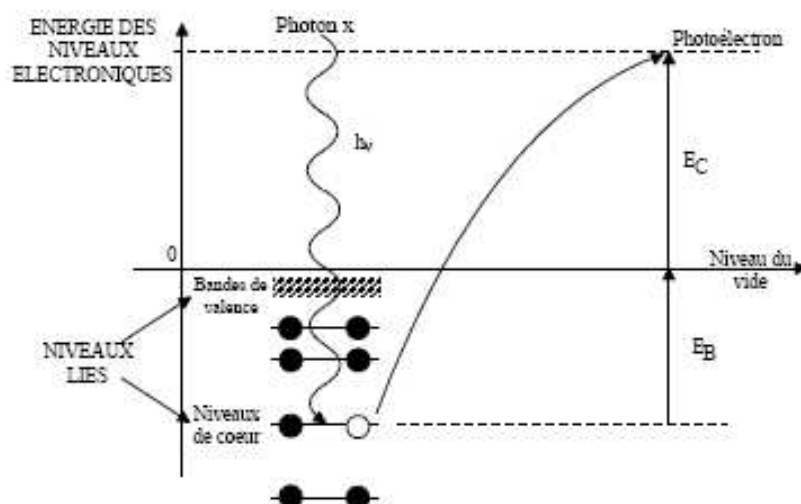


Figure 69 Diagramme énergétique de la photoémission (source : biophyresearch, analyse ESCA).

Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS)

La spectroscopie d'adsorption des rayons X, dont l'analyse XANES (X-ray absorption near-edge spectroscopy) fait partie, permet de sonder l'ordre local autour d'un atome d'une espèce chimique donnée dans un matériau complexe, de déterminer la valence de l'atome et de connaître la géométrie du site. Contrairement à la spectroscopie de photoélectron qui étudie les niveaux électroniques occupés de l'atome, la spectroscopie d'absorption étudie les niveaux électroniques inoccupés des atomes du matériau.

En effet, l'échantillon, soumis à un flux de photons X, absorbe une partie des photons, ce qui conduit à l'excitation ou l'ionisation d'un électron de cœur (couches K, L, M...) de l'atome sondé. Les spectres XANES représentent la variation du coefficient d'absorption (μ) des rayons X en fonction de leur énergie ($h\nu$) à un angle fixe. Lorsque l'énergie du photon est supérieure à l'énergie d'ionisation de l'atome il y a émission d'un photoélectron.

Si l'énergie cinétique de ce photoélectron est faible, son temps de vie est long, il est alors diffusé par les atomes localisés à grande distance, c'est le régime de diffusion multiple qui caractérise le XANES. Au contraire, lorsque l'énergie cinétique est élevée, l'électron est éjecté ce qui crée des phénomènes d'interférence, c'est le domaine de l'EXAFS.

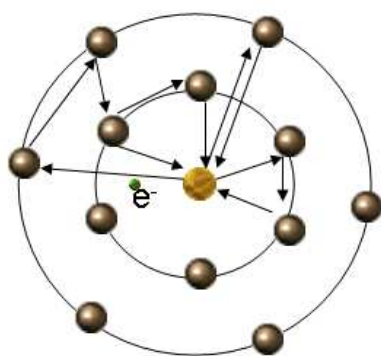


Figure 70 – Diffusion multiple d'un photoélectron par les atomes des premières sphères de coordination.

Mobilité électrophorétique

Les colloïdes, lorsqu'ils sont en suspension dans un fluide, possèdent une charge nette de surface qui affecte la distribution des ions à l'interface solide-liquide. En effet, si les colloïdes sont chargés négativement cela favorise la présence d'ions du solvant chargés positivement (appelés contre-ions) dans un voisinage proche du colloïde. Ces ions forment une couche compacte fortement liée à la surface du colloïde appelée couche de Stern dans laquelle on distingue, dans certains modèles, deux sous-couches (Helmholtz). Cette première couche fortement liée à la surface a une épaisseur de quelques molécules de solvant seulement et est limitée par le plan de cisaillement. La présence d'une charge globale dans cette première couche génère un profil ionique (couche diffuse) dans la solution, dont la portée est définie par la longueur de Debye (qui décroît avec la force ionique). Les ions et molécules de cette couche ne sont pas liés à la particule mais subissent le cisaillement dû à son déplacement. Le potentiel électrostatique au plan de cisaillement (séparation couche de Stern couche diffuse) est appelé potentiel zêta (ζ). Il est mesuré lors d'expérience de mobilité électrophorétique. Dans le cas des surfaces dures, il correspond au potentiel d'entrée de la couche diffuse.

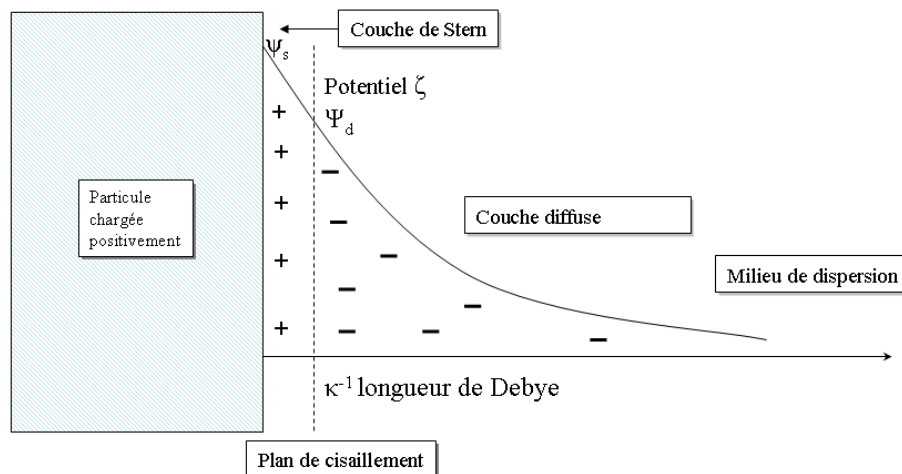


Figure 71 – Représentation de l'évolution du potentiel électrique d'une particule chargée en fonction de la distance à la surface.

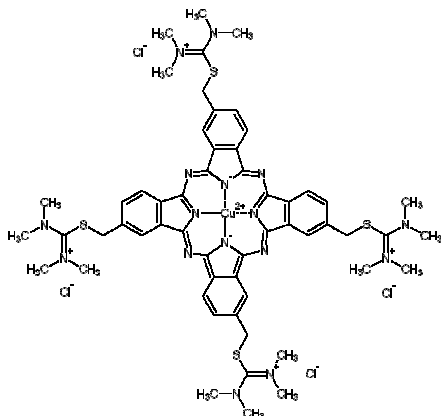
Le potentiel zêta est calculé à partir de la mobilité électrophorétique des colloïdes par l'équation de Henry.

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(kr)}{3\eta}$$

avec ζ	potentiel zêta
U_E	mobilité électrophorétique
ε	constante diélectrique
η	viscosité
$f(kr)$	fonction de Henry
k	paramètre de Debye Huckel
r	rayon de la particule

L'approximation de Smoluchowski ($kr \gg 1$) est généralement appliquée pour des colloïdes supérieurs à 0,2 μm , dans des solutions aqueuses de force ionique modérée. Celle-ci approxime la fonction de Henry à 1,5.

Utilisation du bleu Alcian en microscopie



Le bleu alcian est un colorant cationique qui se lie par interactions électrostatiques aux macromolécules chargées négativement. Ce cation tétravalent (phtalocyanine contenant du cuivre) colore en bleu les mucopolysaccharides et les glycoaminoglycanes (aussi appelée coloration Van Gieson). Il permet également de rigidifier ces structures fragiles et de les rendre plus denses aux électrons afin de les rendre observables par les méthodes de microscopie électronique.

Figure 72 Formule semi-développée du bleu alcian.

Séchage au CO₂ supercritique

Le séchage au CO₂ supercritique a été utilisé lors de la préparation des échantillons de bactéries visualisés en MEB. C'est une méthode souvent utilisée pour sécher un gel ou un objet biologique délicat sans changer sa structure. Son grand intérêt est qu'il permet de retirer le solvant de l'échantillon tout en évitant l'apparition des forces capillaires. En effet, celles-ci provoqueraient irrémédiablement une contraction irréversible des polymères.

Le principe du séchage supercritique repose sur une variation de pression et de température du liquide afin de l'amener dans son domaine supercritique, puis de contourner le point critique pour transformer le fluide directement en vapeur.

La première étape du séchage supercritique comprend un échange de solvants. Le solvant de l'échantillon (ici l'eau) est échangé avec un solvant miscible au CO₂ (par exemple l'acétone ou l'isopropanol).

Puis ce solvant est extrait par du CO₂ liquide. Une fois que cette étape a été complétée (c'est-à-dire que le mélange isopropanol-CO₂ dans l'échantillon a été remplacé par du CO₂ pur), il s'agit d'évacuer le CO₂ par des variations de température et pression. La difficulté est de conserver un système monophasique (en contournant le point supercritique) afin d'éviter l'apparition d'interfaces (solide/liquide ou liquide/gaz) à l'origine de phénomènes capillaires.

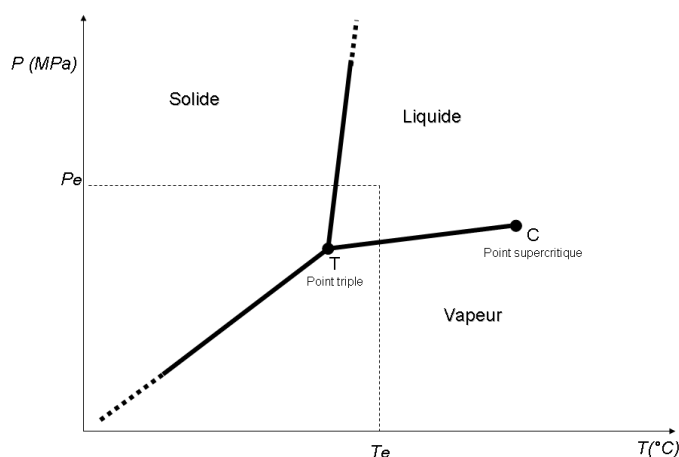


Figure 73 Diagramme de phase typique présentant les trois phases (solide, liquide, vapeur) d'un composé ainsi que le point triple (T : coexistence des trois phases) et le point supercritique (C : au-delà duquel le fluide possède les caractéristiques du liquide et du gaz).

Test de survie – Dépôts en gouttes sur substrat solide

Les tests de survie en gouttes permettent d'obtenir rapidement un ordre de grandeur de la mortalité bactérienne provoquée par un toxique.

Un aliquot de culture de chacune des conditions testées est placé dans la première colonne d'une plaque multipuits (Figure 74). Les cultures sont ensuite diluées de proche en proche à l'aide d'une pipette multicanaux de manière à obtenir un facteur de dilution identique entre chaque série de colonnes (exemple : le puits A6 est une dilution par 10 du puits A5, et le puits B6 est une dilution par 10 du puits B5). Lorsque toutes les dilutions désirées ont été effectuées, quelques microlitres de chaque série sont déposés sous forme de gouttes espacées sur une boîte de Pétri contenant du milieu de culture gélosé (condition stérile : hotte à flux laminaire). Une série de dilutions de la condition « témoin » est déposée sur chaque boîte pour permettre une comparaison. Les boîtes sont ensuite placées dans leur incubateur puis lues lorsque les colonies sont suffisamment importantes pour être visibles sur chaque goutte. Les boîtes se lisent de façon qualitative par comparaison de la concentration apparente d'une série par rapport à une autre.

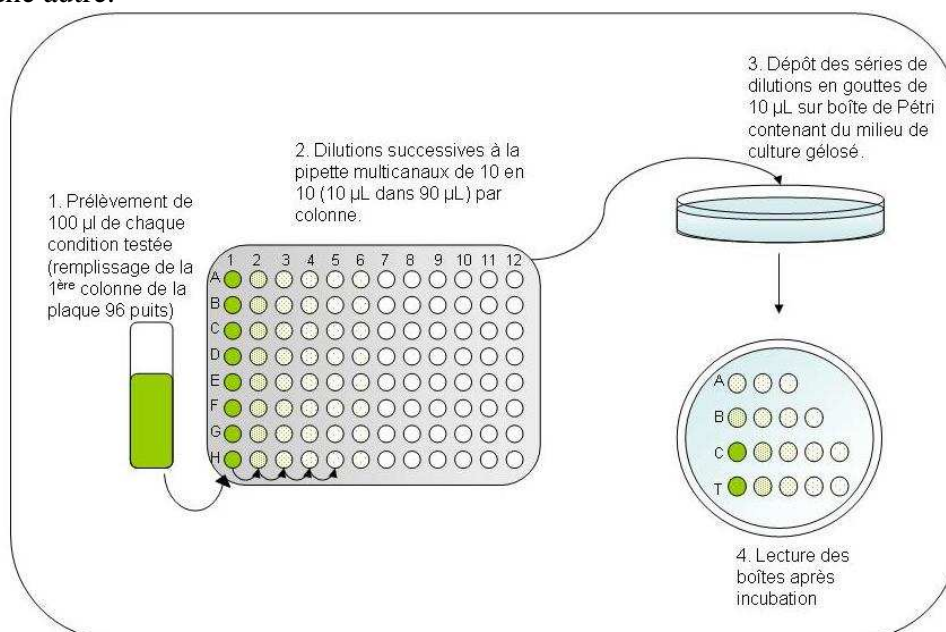


Figure 74 Illustration simplifiée du principe du test de survie en gouttes.

Dans l'exemple de l'illustration, la série C montre une mortalité identique à celle de la série T (témoin), tandis que les séries A et B montrent respectivement des mortalités 100 fois et 10 fois plus importantes que celle de la série témoin. En effet, la dernière dilution de la série T contient environ la même densité de colonies de bactéries que l'avant dernière dilution de la série B et que l'avant-avant dernière dilution de la série A.

Ce test ne permet pas de connaître exactement le pourcentage de bactéries vivantes ou mortes mais il donne des indications sur la mortalité en présence d'un toxique et permet de prévoir les dilutions à effectuer lors d'un test de survie plus détaillé (voir test CFU).

Test de survie - Comptage des colonies après étalement sur substrat solide (CFU)

Le principe du test de survie par dénombrement de colonies repose sur le fait qu'une unique bactérie donne lieu à une colonie. Les bactéries ne sont dénombrables que par approximation statistique au cours d'observations microscopiques, en revanche les colonies sont elles discernables à œil nu. A partir du nombre de colonies obtenu il est donc possible d'en déduire le nombre de bactéries initialement étalées sur la boîte de Pétri. Ce test est appelé « CFU test » pour « Colony Forming Units test ».

Comme pour le test en gouttes, le test CFU repose sur des dilutions successives de la culture dans le milieu utilisé pour le test. La différence réside dans le fait que les dilutions ne se font pas en série dans des plaques 96 puits mais une par une dans des tubes en plastique (Figure 75) et qu'une boîte de Pétri ne contient qu'une seule dilution. Une goutte de la dilution désirée est étalée sur le milieu gélosé de façon à obtenir des colonies bien individualisées. Les dilutions sont calculées et réalisées de manière à obtenir environ 100 à 150 colonies par boîtes pour une bonne représentation statistique. En général, seules les deux ou trois dernières dilutions sont étalées sur boîte de Pétri. Chaque concentration de toxique testée correspond donc à 6 ou 9 boîtes étalées. Les tests CFU sont donc beaucoup plus longs et lourds à réaliser que les tests en gouttes mais ils permettent d'obtenir des résultats quantitatifs précis sur la survie.

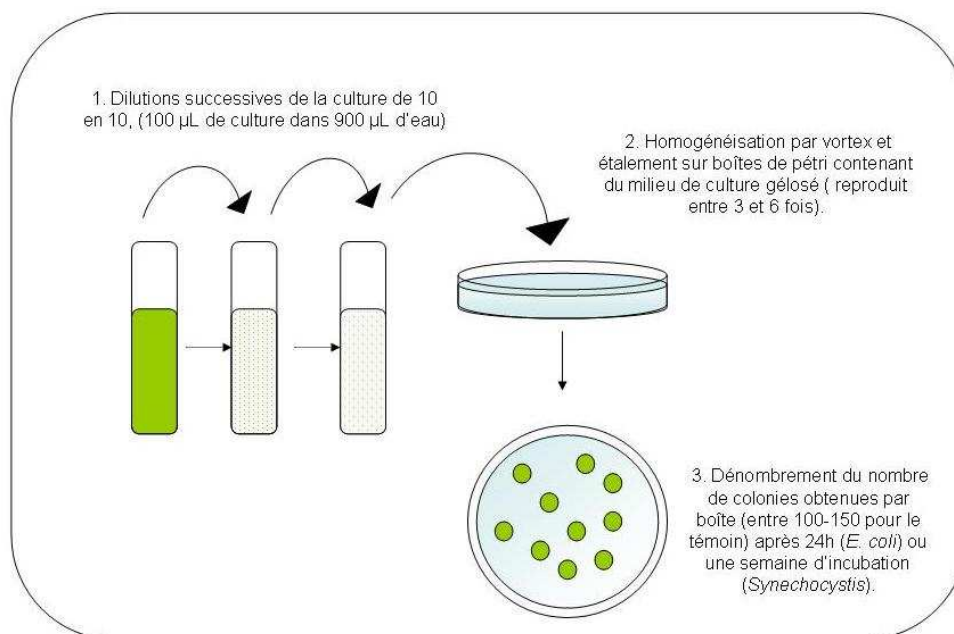


Figure 75 Illustration simplifiée du principe du test CFU.

Test d'intégrité membranaire - LIVE/DEAD[®]

Le test LIVE/DEAD[®] d'Invitrogen permet de déterminer l'intégrité membranaire d'une population de bactéries et d'en déduire le pourcentage de bactéries vivantes par rapport aux bactéries mortes.

Il est basé sur l'utilisation de deux marqueurs fluorescents : le SYTO 9, colorant des acides nucléiques, fluoresçant dans le vert (500 nm) et l'iodure de propidium, également colorant des acides nucléiques mais fluoresçant dans le rouge (635 nm). Ils sont tous deux excités à une longueur d'onde de 485 nm. Lorsque le SYTO 9 est utilisé seul, il pénètre dans toutes les bactéries (avec une membrane endommagée ou non).

L'iodure de propidium ne pénètre que dans les bactéries dont la membrane est endommagée. Lorsque les deux colorants sont présents dans une même culture, il y a compétition cinétique entre les deux colorants pour pénétrer dans les cellules et atteindre les sites où ils peuvent se lier aux acides nucléiques ; en conséquence, l'intensité de fluorescence du SYTO 9 décroît en présence d'iodure de propidium.

Le rapport d'intensités de fluorescence des deux colorants permet d'en déduire le pourcentage de cellules vivantes dans l'échantillon.

Le kit LIVE/DEAD[®] L7007 est composé de deux mélanges (A et B) des marqueurs fluorescents (SYTO 9 et iodure de propidium) afin de permettre la préparation d'un mélange LIVE/DEAD aux proportions adaptables aux conditions de chaque test.

Composé A : SYTO 9 (1,67 mM) et iodure de propidium (1,67 mM) dans le DMSO

Composé B : SYTO 9 (1,67 mM) et iodure de propidium (18,3 mM) dans le DMSO

Les avantages du LIVE/DEAD[®] sont :

- La simplicité d'utilisation car il ne nécessite pas de séries de dilution importantes comme pour les tests sur boîtes,
- Le résultat est obtenu le jour même du test,
- il n'y a pas de décalage de temps d'incubation entre chaque condition,
- L'obtention d'une information sur les cellules vivantes et mortes et non uniquement sur leur capacité à se reproduire (cf. tests de survie sur boîtes)
- Son insensibilité à la floculation des bactéries
- et il permet l'utilisation de plaques multipuits et donc de tester de nombreuses conditions différentes le même jour.

Les inconvénients du LIVE/DEAD[®] sont :

- une interaction potentielle avec le milieu de culture et nécessite donc une étape de lavage des cultures avant d'introduire les colorants,
- les marqueurs utilisés étant des intercalants de l'ADN, il faut prendre des précautions pour les manipuler,
- et comme tout test fluorescent il y a possibilité d'interaction avec les nanoparticules.

Interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement.

Grâce à leurs propriétés particulières dues à leur petite taille, les nanomatériaux (dimension < 100 nm) sont utilisés dans de nombreuses applications grand public (cosmétique, matériaux nanostructurés,...). Cependant, leur présence grandissante inquiète car leur impact potentiel sur les humains et l'environnement reste mal connu. Cette étude est consacrée à une compréhension approfondie des interactions physicochimiques et biologiques entre deux modèles cellulaires présents dans l'environnement : *Synechocystis* (cyanobactérie contribuant au maintien de la biosphère) et *Escherichia coli* (bactérie des intestins des mammifères) avec des nanoparticules d'oxyde de cérium (abondance environnementale croissante, ex : additif au diesel).

La complexité de l'étude des nanoparticules nécessite une approche différente (multidisciplinaire) de celle des tests de toxicité utilisés pour les composés classiques. En effet, nous montrons que les paramètres physicochimiques (stabilité, agrégation, dissolution et état de surface) des nanoparticules dans le milieu de contact, influencent fortement la toxicité observée sur les cellules. De plus, les interactions physicochimiques (floculation, adsorption, mécanismes redox) sont liées au modèle biologique, en particulier à la présence d'exopolysaccharides (chez *Synechocystis*) comme barrière naturelle entre la paroi cellulaire et les nanoparticules. La composition du milieu de dispersion des nanoparticules (notamment son pH) a aussi une influence majeure sur la toxicité (survie et intégrité membranaire). Tandis que pour *E. coli*, ce sont majoritairement les nanoparticules qui provoquent la mortalité (confirmé par analyses métabonomiques par RMN).

Physicochemical and biological interactions between manufactured nanoparticles and environmental bacteria.

Thanks to their particular properties due to their size, the nanomaterials (dimension < 100 nm) are widely used in many industrial applications (daily care products, nanostructured materials...). However, their growing use frightens because of their uncertain impact on humans and environment. This study is dedicated to a deep understanding of the physicochemical and biological interactions between two cellular models from the environment: *Synechocystis* (cyanobacteria essential for the biosphere) and *Escherichia coli* (bacteria of mammalian intestines) with cerium oxide nanoparticles (ex: diesel additive).

The complexity of the study of nanoparticles requires a different approach (multidisciplinary) from those of toxicity tests of classic compounds. Indeed, we showed that the physicochemical parameters (stability, aggregation, dissolution and surface chemistry) of nanoparticles in the contact medium, strongly influence the toxicity. Furthermore, the physicochemical interactions (flocculation, adsorption, redox mechanisms) are linked to the biological model and especially the presence of exopolysaccharides (for *Synechocystis*) as natural barrier between the cell wall and the nanoparticles. Moreover, the composition of the nanoparticles dispersion medium (particularly the pH) has a major influence on the toxicity (survival and membrane integrity), whereas for *E. coli*, the nanoparticles are the main culprits for the mortality (confirmed by metabonomic studies via NMR).